

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Microbiología II**



**TESIS DOCTORAL**

**Papel de la colonización por clones de alto riesgo en la transmisión e  
infección por *Enterococcus faecium***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Ana María Sánchez Díaz**

**Directores**

**Rafael Cantón Moreno**  
**Patricia Ruiz Garbajosa**

**Madrid, 2018**





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

**Papel de la Colonización por Clones de Alto  
Riesgo en la Transmisión e Infección por  
*Enterococcus faecium***

Memoria para optar al Grado de Doctor presentada por

**ANA MARÍA SÁNCHEZ DÍAZ**

**Directores**

**Dr. Rafael Cantón Moreno    Dra. Patricia Ruiz Garbajosa**





La Dra. Patricia Ruiz Garbajosa, Facultativo Especialista de Área del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid

El Dr. Rafael Cantón Moreno, Jefe de Servicio del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid,

CERTIFICAN QUE:

ANA MARÍA SÁNCHEZ DÍAZ ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor, con el título:

**“Papel de la Colonización por Clones de Alto Riesgo en la Transmisión e Infección por *Enterococcus faecium*”**

Y para que así conste, firmamos la presente certificación en Madrid, a 7 de abril de 2017

Fdo.:

Fdo.:

Dra. Patricia Ruiz Garbajosa

Dr. Rafael Cantón Moreno



*A Alex*

*A mis padres y mis hermanos,*



*“Climbing a mountain is never easy.*

*It requires courage,*

*focus*

*determination*

*pushing us beyond*

*our limitations.*

*a little more stronger than before;*

*A little more wiser than before.”*

*Satsuki Shibuya*





## AGRADECIMIENTOS

En este momento de reflexión y gratitud en el que echo la vista atrás, me doy cuenta de la cantidad de personas importantes que han formado y forman parte de este camino...

A mis directores de tesis Rafael Cantón y Patricia Ruiz por darme la oportunidad, no sólo de poder llevar a cabo esta tesis doctoral, sino también de desarrollarme profesional y personalmente en su equipo durante estos ocho años. Por la ilusión y apoyo, porque a veces uno necesita que crean en él para demostrar de lo que es capaz. Gracias.

A Rosa y Ana Sofía no solo por su inestimable ayuda en el análisis y enfoque de esta tesis doctoral sino por la motivación, ilusión y el corazón que imprimen en todo lo que hacen. Sin vuestra generosidad y cariño no habría sido posible.

Al grupo de investigación de la Dra. Laura García Bermejo, pero en especial a Eli y a ella misma por las horas que se pasaron acunando con nosotras a esas células y todo el cariño que me han demostrado en estos años de colaboración científica.

Al grupo de investigación del Dr. Mollby del MTC del Karolinska Institutet de Estocolmo, a Dae Ho, Dra. Ingher Kühn, Masfikur y especialmente a la Dra. Patricia Colque por todo el tiempo, dedicación e innumerables risas que me dedicaron durante mi estancia en su laboratorio.

A Fede, por conseguir ilusionarme lo suficiente para que la microbiología dejara de ser una asignatura más y se convirtiera en un proyecto profesional.

A María Díez, a Bea y a Irenita por ser tres de las personas más maravillosas con las que he tenido y tengo la suerte de compartir camino, por vuestra fuerza, luz y belleza.

A Lana y a Cris por ser un ejemplo de superación constante y dos de las personas imprescindibles en mi vida.

A Juande y a Carla por pintarle una sonrisa a cada día y a mí misma, cuando no la encontraba, por vuestra genialidad y demostrarme lo que es la verdadera amistad.

A mis co-Rs: a Claudio y Ana Luisa, por vuestro humor único y amistad, pero en especial a mi medio hermana sueca, Adri, por estar ahí siempre que lo he necesitado

A Desirée y a María Galvez, mi hermana y madre “microbiológicas”, por ser dos ejemplos de fortaleza además de importantes referentes personales para mí.

A los que primero fueron mis compañeros residentes y después amigos, Irene, Laurita, Sergio, Gustavo, Juanma, Rubén, Lorena y María, por hacer de la residencia y lo que ha venido después, una de las mejores etapas de mi vida.

A Mario y Oihane por apoyarme siempre y ser un ejemplo de constancia y trabajo bien hecho.



A Esther, Ana Moreno, Mari García, a las “Martitas” y a Blanca por vuestra disposición a ayudar siempre con una sonrisa y por todo vuestro apoyo y cariño en el día a día. A Marisa Morosini, María Meseguer, Mercedes Subirats, Enrique, Juan Carlos, Mari Jose, Lourdes, Paqui y Maribel, por transmitir esa ilusión imprescindible para trabajar en este campo y por compartir conmigo un poquito de todo lo que sabeis. A todos los compañeros de investigación, residentes del servicio y facultativos del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal por su ayuda en el día a día.

A los “cuatro fantásticos” con los que me topé subiendo por las paredes Melati, Sergio, Marta y Eu, por demostrarme que uno no deja de encontrarse personas maravillosas en el camino

A mis amigos del clan de los “farmacéuticos atípicos”, Fer, Estefa y Fran, por ayudarme a descubrir otro lado de mí, por servirme de ejemplo de valentía y superación.

A mis “pantojillos”, Pedro y Anita “portu” y Alex y Alok por ser mi familia marsellesa y sueca.

À la communauté francophone de ma vie, José Manuel, Carolina, Gloria y Mariano, pour faire de l'apprentissage de cette belle langue un voyage où l'amitié et l'autoconnaissance ont été les moteurs.

A Alberto, Diana, Loli y Bea, por el camino que hemos recorrido juntos y demostrarme que hay amistades muy importantes que son capaces de superar la barrera del tiempo y la distancia.

A todos los que en la distancia me habeis ayudado de una u otra manera, con vuestro apoyo, cariño y humor.

A mi familia, a todas y cada una de las personas tan importantes que la conforman, mis tíos, mis primos, Elena, Denis...pero en especial a mis hermanos Carlos y Nacho por ser mis compañeros de viaje, mis referentes y apoyo constante, luchadores, pero sobre todo increíbles personas.

A mis padres, Martín y Juani, porque sólo con el tiempo uno se da cuenta de la cantidad de tiempo, cariño, paciencia y amor que le han dedicado a uno y de los valores que a la larga terminan forjando nuestra personalidad y manera de ver el mundo. Gracias a los dos porque sin vosotros no habría llegado hasta aquí.

A mis abuelas Mere y Elena, por su lucha y superación continua y por hacer de la palabra familia el lugar más bonito que conozco.

A Alex, por tu amor, paciencia y enorme corazón, por ayudarme a sacar siempre una sonrisa hasta en los momentos más complicados, Gracias.

Gracias a todos vosotros por hacer que este largo viaje, que ahora llega a su fin, haya merecido la pena.

***“Siempre parece imposible, hasta que se hace”***

**Nelson Mandela**



## ABREVIATURAS

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**ARN** Ácido ribonucleico

**ATB** Antibióticos

**BAPS** Bayesian analysis of population structure

**BHI** Infusión cerebro-corazón

**BLEE** Beta-lactamasas de espectro extendido

**DMEM** Medio esencial Eagle modificado de Dulbecco

**DO** Densidad óptica

**EfmRA** *Enterococcus faecium* resistente a ampicilina

**EN** Episodio de neutropenia

**EPC** Enterobacterias productoras de carbapenemasas

**EVR** Enterococo resistente a vancomicina

**EfVR** *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina

**LMA** Leucemia mieloide aguda

**LLA** Leucemia linfocítica aguda

**LMC** Leucemia mieloide crónica

**m-Ent** Medio m-*Enterococcus*

**MLST** Multilocus sequence typing

**PBPs** Proteínas de unión a penicilina (*penicillin binding protein*)

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**PEL** Profilaxis extendida con levofloxacino

**PFGE** Pulsed- field gel electrophoresis

**Pos-PEL** Fase posterior a la administración de profilaxis extendida con levofloxacino

**TER** Resistencia eléctrica transepitelial

**TGI** Tracto gastrointestinal

**Levo** Levofloxacino

**Ran-St** Resistencia a estreptomicina de alto nivel

**Ran-G** Resistencia a gentamicina de alto nivel

**E** Eritromicina

**QD** Quinupristina-dalfopristina



## LISTADO DE FIGURAS

**Figura 1.** Producción de bacteriocinas en una muestra fecal de un bebé de 6 meses y mecanismo de acción propuesto para una bacteriocina de clase II.

**Figura 2.** Principales mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida descritos para las especies del género *Enterococcus*.

**Figura 3.** Síntesis del peptidoglicano y mecanismo de acción de los glucopéptidos.

**Figura 4.** Principales mecanismos moleculares de resistencia a linezolid en *E. faecium*.

**Figura 5.** Diagrama eBURST que representa la estructura poblacional de *E. faecium*.

**Figura 6.** Estructura química de las principales fluoroquinolonas.

**Figura 7.** Periodos del estudio y esquema de recogida de muestras de heces de los pacientes reclutados para el estudio.

**Figura 8.** Distribución de los sustratos en las Enterococci Phene plates.

**Figura 9.** Esquema de las reacciones químicas que tienen lugar en el proceso de pirosecuenciación.

**Figura 10.** Esquema simplificado del método de Livack aplicado para el cálculo de la cantidad relativa de cada una de las dianas en las muestras de heces del ingreso (PEL y Pos-PEL) con respecto a la muestra basal.

**Figura 11.** a) Tasa de colonización por EfmRA previa a la administración de profilaxis (Basal), durante la PEL y tras su retirada (Pos-LEP); b) Tasas de adquisición y persistencia de colonización por EfmRA durante el primer EN en los diferentes sub-periodos.

**Figura 12.** Dendrograma de los distintos clones aislados por paciente obtenido mediante el método UPGMA, clasificados mediante las distintas herramientas de tipado (PFGE, MLST y BAPS) y perfil de resistencia antibiótica de los aislados.

**Figura 13.** Dinámica de colonización de EfmRA a lo largo de los tres años del estudio.

**Figura 14.** Diagramas que muestran la concordancia entre la tipificación molecular mediante PFGE y la tipificación fenotípica mediante el PhP para los valores de similitud 0,975; 0,95 y 0,9 (de arriba abajo).

**Figura 15.** Presencia de genes que codifican las bacteriocinas EntA, EntB, EntQ, EntP, EntL50, Bac32 y Bac43 en los diversos clones de EfmRA detectados durante el estudio (un representante por clon) y detección de la producción de bacteriocinas *in vitro* empleando cada uno de los clones como cepa indicadora y el resto como problema.

**Figura 16.** Cronograma de los acontecimientos producidos durante los ingresos del paciente en el que se detectó resistencia de linezolid en aislados de colonización de EfmRA, estado clínico, antibióticos administrados (ATB) y muestras recogidas durante ambos ingresos (muestras de heces, MH y hemocultivos, (HC).

**Figura 17.** Patrones de PFGE-*Sma*-I, CMIs a linezolid y número de alelos mutados (23S rADN) de los aislados de EfmRA con resistencia a linezolid.

**Figura 18.** Abundancia relativa de *E. faecium*, *Enterococcus* spp. y bacterias totales en muestras de heces de pacientes colonizados y no colonizados por EfmRA durante la profilaxis extendida con levofloxacino (PEL) y pos-profilaxis (Pos-PEL) con respecto a las muestras basales cuantificada mediante qPCR.

**Figura 19.** Modelo de infección de *S. gallolyticus* propuesto por Boleij y cols. en 2011.

**Figura 20.** Estructura molecular de las uniones estrechas en las células epiteliales intestinales.

**Figura 21.** Microfotografía del estado de un cultivo de células Caco-2 en distintos momentos (24, 48 y 96 h) tras la siembra de  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

**Figura 22.** Sistema de medida de la resistencia trans-epitelial (TER). Voltímetro empleado y su correcta disposición en el dispositivo transwell.

**Figura 23.** Esquema del ensayo de translocación.

**Figura 24.** Evaluación de la integridad de la monocapa de células Caco-2 mediante tinción inmunofluorescente de las proteínas ZO-1, E-cadherina, Paxilina y Actina.

**Figura 25.** Adherencia (superior) e invasión (inferior) de las células Caco-2 de los aislados de *E. faecium* y *S. gallolyticus*.

**Figura 26.** Producción de biopelículas sobre distintas superficies: poliestireno, colágeno I y colágeno IV. Los aislados se clasificaron como no productores ( $DO_{600} < 0,120$ ), productores débiles ( $0,120 < DO_{600} \leq 0,240$ ) o altos productores ( $DO_{600} > 0,240$ ).

**Figura 27.** Evolución temporal de la TER y translocación de los aislados de *S. gallolyticus* (A y B respectivamente) y de *E. faecium* (C y D respectivamente).

**Figura 28.** Evolución de la resistencia a vancomicina (2012 y 2015) en aislados invasivos de *E. faecium* en los diferentes países europeos.

**Figura 29.** Mecanismo de regulación de la transcripción de los operones VanA y VanB.

**Figura 30.** Principales rutas propuestas en la transmisión de enterococos en el hospital.

**Figura 31.** Crecimiento de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (EVR) detectados en los medios selectivos para EPC y Enterobacterias productoras de BLEEs.

**Figura 32.** Estructura general del prototipo de operón *vanA* (Tn1546) y localización de los 10 fragmentos solapantes y los cebadores empleados en su amplificación

**Figura 33.** Esquema del estudio de la transmisión dedo-dedo.

**Figura 34.** Distribución temporal y por servicio de los casos (colonización/infección) de EVR. Los asteriscos indican los aislamientos procedentes de muestras clínicas.

**Figura 35.** PFGE-*Sma*I de algunos de los aislados de EVR detectados durante el brote.

**Figura 36.** Estructura del transposón Tn1546 y localización del gen *vanA*.

**Figura 37.** Eficiencia de la transmisión dedo-dedo. En el gráfico superior se esquematiza los perfiles de transmisión de las cepas *E. faecium* L50 y en la parte inferior, los de *E. faecium*-ST117.

## LISTADO DE TABLAS

**Tabla 1.** Factores asociados a virulencia en *E. faecium* (modificado de Sava y cols., 2010).

**Tabla 2.** Tipos de resistencia adquirida a glucopéptidos en el género *Enterococcus*.

**Tabla 3.** Microorganismos aislados de muestras de hemocultivos de pacientes neutropénicos de alto riesgo con neutropenia febril.

**Tabla 4.** Cebadores específicos y temperaturas de melting (T<sub>m</sub>) empleadas en la amplificación de genes de MLST.

**Tabla 5.** Cebadores específicos T<sub>m</sub> empleadas en la amplificación de los genes estudiados para la caracterización molecular de la resistencia a linezolid.

**Tabla 7.** Cebadores específicos y T<sub>m</sub> empleadas en la amplificación de genes asociados a virulencia y bacteriocinas.

**Tabla 8.** Análisis de las variables asociadas con la colonización de los pacientes por EfmRA durante los periodos de PEL y Pos-PEL.

**Tabla 9.** Diversidad clonal, presencia de genes asociados a virulencia y co-resistencias de los aislados de EfmRA de colonización y muestras clínicas.

**Tabla 10.** Poder discriminatorio del PhP y PFGE para los distintos niveles de similitud comparados

**Tabla 11.** Resultados del análisis de clasificación cruzado de todas las parejas de aislados de EfmRA posibles en función del acuerdo o desacuerdo entre PFGE y PhP con tres niveles de similitud distintos (0,975; 0,95 y 0,95).

**Tabla 12.** Concentraciones optimizadas de cebadores y sonda para las qPCR (16 S rADN, 23S rADN, *ddl*) y valores de eficiencia.

**Tabla 14.** Características de los aislados empleados en este capítulo.

**Tabla 15.** Resumen de la capacidad de translocación, adhesión, invasión y formación de biopelículas *in vitro*.





## ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS .....	17
LISTADO DE TABLAS .....	19
RESUMEN .....	25
SUMMARY .....	29
INTRODUCCIÓN .....	33
1. El género <i>Enterococcus</i> .....	3
1.1. Perspectiva histórica .....	3
1.2. Fisiología y filogenia .....	4
1.3. Ecología: colonización del tracto gastrointestinal.....	5
2. <i>Enterococcus faecium</i> .....	7
2.1. Factores asociados a virulencia y persistencia .....	7
2.2. Resistencia antibiótica .....	10
2.5. Métodos de tipado y estructura poblacional.....	24
CAPÍTULO I .....	29
ANTECEDENTES .....	31
1. Pacientes oncohematológicos .....	31
2. Infecciones en el paciente neutropénico .....	31
3. Medidas profilácticas de la infección en el paciente neutropénico .....	32
3.1. Infección de origen exógeno .....	32
3.2. Infección de origen endógeno .....	32
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	37
MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
1. Diseño del estudio .....	39
2. Definiciones .....	40
3. Recogida y procesamiento de muestras.....	40
3.1. Muestras fecales.....	40
3.2. Muestras clínicas .....	42
4. Identificación bacteriana .....	42
5. Análisis de la estructura poblacional.....	42
5.1. Electroforesis en campo pulsado (PFGE) .....	42
5.2. Multi Locus Sequence typing (MLST) .....	44
5.3. Sistema Phene Plate™ (PhP System) .....	46
6. Estudio de sensibilidad antibiótica .....	49

6.1. Difusión con disco y microdilución .....	49
6.2 Caracterización de la resistencia a linezolid .....	49
7. Determinantes de virulencia.....	52
7.1. Presencia de genes asociados a virulencia y endemicidad.....	52
7.2. Producción de bacteriocinas .....	52
8. Cambios en la microbiota intestinal.....	53
8.1. Selección de muestras .....	53
8.2. Extracción de ADN de muestras de heces .....	54
8.3. PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR).....	54
9. Análisis estadístico .....	57
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
1. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes.....	59
2. Infecciones clínicas.....	60
3. Dinámica de colonización de EfmRA.....	60
4. Factores de riesgo de colonización por EfmRA .....	61
5. Estructura poblacional y diversidad clonal de EfmRA.....	62
5.1. PFGE y MLST.....	62
5.2. Sistema Phene Plate™ (PhP System) .....	66
6. Características microbiológicas de EfmRA .....	70
6.1. Resistencia antibiótica.....	70
6.2. Factores asociados a virulencia y producción de bacteriocinas .....	70
7. Emergencia de resistencia a linezolid in vivo.....	72
7.1. Descripción del caso clínico .....	72
7.2. Caracterización molecular de los aislados de EfmRA .....	72
7.3. Caracterización molecular de la resistencia a linezolid.....	73
8. Estudio por qPCR de los cambios en la microbiota intestinal de pacientes oncohematológicos .....	74
8.1. Optimización y validación de las qPCR .....	74
8.2. Cambios en la microbiota de pacientes oncohematológicos.....	75
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>79</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>81</b>
1. <i>Streptococcus</i> del grupo D .....	81
1.1. Taxonomía.....	81
1.2. Importancia clínica .....	82
2. El epitelio intestinal humano.....	83
2.1. Estructura .....	83
2.1. Translocación.....	84

2.1.2. Modelos de estudio de translocación bacteriana in vitro: células Caco-2 .....	85
3. Importancia de la adhesión y formación de biopelículas .....	85
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>87</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>89</b>
1. Selección de aislados bacterianos y condiciones de cultivo .....	89
2. Línea celular: células Caco-2 .....	89
2.1. Descongelación y propagación .....	90
2.2. Siembra de Células Caco-2 .....	91
2.3. Inmunohistoquímica y microscopía confocal.....	91
3. Ensayos de adhesión.....	92
4. Ensayos de invasión celular.....	92
5. Estudio de translocación bacteriana.....	93
5.1. Medida de la resistencia transepitelial .....	93
5.2. Ensayo de translocación bacteriana.....	94
6. Formación de biopelículas in vitro .....	95
7. Análisis estadístico .....	95
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>97</b>
1. Grado de diferenciación celular.....	97
2. Adhesión e invasión celular.....	97
4. Formación de biopelículas in vitro.....	99
3. Translocación bacteriana .....	101
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>107</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>109</b>
1. Enterococos resistentes a glucopéptidos .....	109
1.1. Epidemiología en Europa .....	109
1.2. Sistemas de vigilancia europeos .....	110
1.3. Genotipos más frecuentes y regulación de la resistencia a glucopéptidos.....	110
2. Transmisión .....	112
2.1. Fuentes de infección y reservorios.....	113
2.2. Factores dependientes del hospedador .....	113
3. Control de la infección.....	113
3.1. Vigilancia epidemiológica .....	113
3.2. Otras medidas de control de infección.....	114
3.3. Papel del laboratorio de microbiología .....	114
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>115</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>117</b>

1. Descubrimiento del brote .....	117
2. Estudio de clonalidad: PFGE y MLST .....	118
3. Estudio de sensibilidad antibiótica.....	118
3.1. Métodos fenotípicos.....	118
4. Caracterización molecular de la resistencia a glucopéptidos.....	118
4.1. Detección de genes van .....	118
4.2. Determinación de la localización genómica de los elementos van .....	118
4.3. Caracterización de los transposones que codifican para la resistencia a glucopéptidos	120
5. Presencia de genes asociados a virulencia y bacteriocinas .....	123
6. Evaluación de la eficiencia de la transmisión dedo-dedo de <i>E. faecium</i> .....	123
6.1. Selección de aislados y participantes .....	123
6.2. Descripción del modelo de estudio .....	123
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>125</b>
1. Descripción del brote .....	125
2. Caracterización molecular del brote .....	126
2.1. Relación clonal de los aislados y características microbiológicas .....	126
2.2. Caracterización molecular de la resistencia a glucopéptidos .....	127
3. Estudio de la transmisión dedo-dedo .....	129
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>131</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>155</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>175</b>

## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas *Enterococcus faecium* ha pasado de considerarse un simple microorganismo comensal del TGI humano para convertirse en una de las principales causas de infección nosocomial. La emergencia de *E. faecium* como patógeno hospitalario ha coincidido con la diseminación a nivel de una subpoblación genética altamente adaptada al hospital, perteneciente a tres linajes principales: ST17, ST18 y ST 78. Esta subpoblación se caracteriza por presentar resistencia a numerosos antibióticos de uso clínico como la ampicilina, el levofloxacino y en ocasiones también a la vancomicina, además de estar enriquecida en una serie de factores putativos de virulencia.

Los pacientes oncohematológicos en tratamiento quimioterápico tienen un riesgo elevado de desarrollar infecciones que se ha demostrado proporcional a la intensidad y duración de la neutropenia. Con el objetivo de disminuir la incidencia de infección en estos pacientes, se ha generalizado la administración de profilaxis antibiótica, principalmente con fluoroquinolonas. En los últimos años se ha observado un cambio en la etiología de los procesos infecciosos en estos pacientes: mientras que en los años ochenta predominaban los bacilos gramnegativos, en la actualidad han aumentado el porcentaje de las mismas debidas a microorganismos grampositivos. Los principales factores que parecen explicar este cambio son la utilización de quimioterapias más agresivas, la utilización generalizada de catéteres permanentes y el empleo de profilaxis con fluoroquinolonas. La bacteriemia en pacientes neutropénicos se ha asociado a un tercio de los episodios febriles y con frecuencia tienen un origen endógeno en el tracto gastrointestinal del paciente. En los últimos años *E. faecium* se ha convertido en una de las principales causas de bacteriemia en el ámbito hospitalario, especialmente en pacientes con algún tipo de inmunosupresión. Su alta capacidad para colonizar y sobrecrecer en el tracto gastrointestinal de los pacientes y sobre distintas superficies, explica parcialmente su éxito en la diseminación y producción de infección a nivel nosocomial. Sin embargo, la dinámica de estos procesos, así como el conocimiento de las características inherentes a este microorganismo que los favorecen no se conocen en profundidad.

### OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo se organizaron en tres capítulos y se resumen en:

- 1) Estudiar la **dinámica de colonización, estructura poblacional** y características **microbiológicas** de *E. faecium* resistente a ampicilina (EfmRA) en pacientes oncohematológicos a los que se les administra profilaxis extendida con levofloxacino y evaluar **los cambios** que se producen su **microbiota intestinal**.
- 2) Describir la emergencia de **resistencia a linezolid** en aislados de colonización de EfmRA de un paciente oncohematológico y caracterizar el **mecanismo molecular** responsable de la resistencia.
- 3) Comparar la utilidad de la técnica **de tipificación fenotípica PhP** con el PFGE para la caracterización de la estructura poblacional de aislados de colonización y clínicos de *E. faecium*.

- 4) Estudiar y comparar la **capacidad de adhesión, invasión y translocación intestinal** de aislados de *E. faecium* y *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. gallolyticus*) con diferente origen empleando un modelo celular *in vitro*.
- 5) Comparar la capacidad de aislados de *E. faecium* y *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* con diferente origen para **formar biopelículas** *in vitro* sobre distintas superficies.
- 6) Describir y caracterizar molecularmente el aumento de prevalencia en la colonización por *Enterococcus* resistente a vancomicina (EVR) en pacientes ingresados en un hospital terciario con una situación endémica de Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) y las medidas implantadas para su control epidemiológico.

## RESULTADOS

En el **primer capítulo** de esta Tesis se observó que un 61,5% de los pacientes oncohematológicos que recibieron profilaxis con levofloxacino se colonizaron por EfmRA durante su ingreso hospitalario mayoritariamente una vez que se suspendió la profilaxis extendida con levofloxacino (31% de la adquisición de colonización se produjo durante este periodo). La colonización por EfmRA durante la fase de interrupción de la profilaxis con levofloxacino (Pos-PEL) se asoció significativamente ( $p < 0,025$ ) con la fase de la quimioterapia, la presencia de mucositis y con la duración de la neutropenia. Se observó una diversidad clonal muy baja (clones pertenecientes a 24 pulsotipos y 13 ST) que disminuyó durante la estancia hospitalaria. El 94,8% de los aislados (6/13 ST) pertenecieron a los grupos BAPS 2.2<sup>a</sup> y 3.3<sup>a</sup>, asociados al medio hospitalario y presentaron, y fueron resistentes a levofloxacino, eritromicina y presentaron resistencia de alto nivel a estreptomicina ( $> 1000$  mg/L). Durante el periodo de estudio se observó el predominio del clon EfmRA-ST117-B (32,6% de los pacientes) que presentó los factores asociados a virulencia, Esp<sub>Efm</sub> y Acm, produjo bacteriocinas frente a la gran mayoría de clones de *E. faecium* y demostró capacidad para metabolizar los polioles, sorbitol, glicerol y manitol. Este clon fue, junto con los clones EfmRA-ST17, responsables de la colonización persistente de de estos pacientes. *E. faecium* fue la tercera causa más frecuente de bacteriemia en estos pacientes (4,4% de los pacientes) y todos los episodios de bacteriemia se produjeron por el clon prevalente EfmRA-ST117-B, en pacientes previamente colonizados por este clon.

En un subgrupo de 20 pacientes oncohematológicos se estudiaron los cambios cuantitativos que se producían en la población microbiana total y de enterococos durante su ingreso. Se observó la disminución de la carga bacteriana en un 75% (disminución de 0,15-2,33 log) y un 85% (0,05 a 3,16 logs) de los pacientes durante las fases de administración de profilaxis con levofloxacino (PEL) y Pos-PEL respectivamente en comparación a su estado basal. Esta disminución se compensó en los pacientes colonizados por *E. faecium* con un incremento parcial en la población de enterococos y de *E. faecium* en particular.

El empleo de la técnica de tipificación fenotípica PhP demostró una buena concordancia con el PFGE para la caracterización de la estructura poblacional de aislados de *E. faecium* únicamente cuando se empleó un índice de similitud de 0,9.

Se demostró que la emergencia de resistencia a linezolid en dos aislados de colonización de EfmRA tras un tratamiento corto con este antibiótico se debía a la presencia de la mutación G2576T en 4 de los seis alelos del gen 23S rARN.

En el **segundo capítulo** de esta Tesis se profundizó en el conocimiento de las características de la interacción (adhesión e invasión), de *E. faecium* y *S. gallolyticus* de diferentes orígenes, con las células epiteliales intestinales y su capacidad de translocar a través de las mismas. Adicionalmente se evaluó la capacidad de formación de biopelículas sobre distintos soportes. Se observó que la capacidad de adhesión e invasión del epitelio intestinal fue baja para ambas especies. Sin embargo, y aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,43$ ), los aislados de *E. faecium* se adherieron proporcionalmente más. El único aislado que mostró una elevada capacidad de invasión fue Sg78, procedente de un aislado animal y en el que previamente se había detectado resistencia a vancomicina. Todos los aislados de *S. gallolyticus*, formaron en su conjunto, biopelículas sobre superficies ricas en colágeno más frecuentemente que los aislados de *E. faecium* ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, los aislados de *E. faecium* demostraron tener una capacidad de translocación intrínseca muy superior a *S. gallolyticus* aunque se demostraron diferencias importantes intra-especie. Un aislado de bacteriemia y otro de colonización (Efm106-ST18 y Efm-ST121-ST117) de pacientes oncohematológicos demostraron ser los más eficientes translocando ( $p < 0,05$ ).

Por último, en el **tercer capítulo** de esta Tesis se describió la presencia de un brote oculto de EVR en un hospital de tercer nivel gracias a la existencia de un sistema de vigilancia activa de Enterobacterias productoras de carbapenemasas y las medidas empleadas en su control. Se demostró que en todos los aislados de muestras de colonización e infección, menos uno ( $n=54$ ), la resistencia a vancomicina estaba codificada en un transposón Tn1546 y se debía a la presencia del genotipo vanA. Se detectó la presencia de un clon mayoritario EVR-ST17 y cuatro clones minoritarios (EVR-ST117-(B-E)) diseminada en varios servicios del hospital, principalmente medicina interna y nefrología, lugares donde se detectó seis meses antes los casos índice. El estudio de la transmisión dedo-dedo de dos cepas de *E. faecium* sensibles a vancomicina (*E. faecium*-L50-ST178 y *E. faecium* ST117) permitió establecer diferencias inter-individuales importantes.

## CONCLUSIONES

Se ha demostrado que los pacientes oncohematológicos en tratamiento quimioterápico presentan una marcada reducción de la densidad de su microbiota intestinal, principalmente tras la administración de profilaxis extendida con levofloxacino. Cerca de dos tercios de estos pacientes se colonizan de manera persistente por clones hospitalarios de *E. faecium* resistente a la ampicilina. Estos clones son además los responsables de los episodios de bacteriemia registrados durante el estudio. El predominio de el clon EfmRA-ST117-B en nuestro medio podría deberse no solo a la presencia de determinantes de resistencia, sino también a la presencia de determinantes de virulencia ( $\text{Esp}_{\text{Efm}}$ ,  $\text{Hyl}_{\text{Efm}}$ ,  $\text{Acm}$ ), producción de bacteriocinas y capacidad adicional de metabolizar distintos polioles. El aumento en el número de bacteriemias por *E. faecium* puede deberse a su capacidad de translocación intrínseca vía paracelular pese a haber presentado una baja capacidad de adhesión. Se ha demostrado la alta capacidad de los aislados de *S. gallolyticus* de formar biopelículas sobre superficies tapizadas con colágeno. Por último, se ha detectado y caracterizado un brote silente de EVR en un hospital terciario con una prevalencia muy baja ( $<0,5\%$ ) de EVR gracias a un sistema de vigilancia epidemiológica, lo que corrobora la alta capacidad para diseminarse de este microorganismo. Existe una alta variabilidad inter-individual en la transmisión de *E. faecium*.





## SUMMARY

### INTRODUCTION

In the last decades *Enterococcus faecium* has evolved from being considered as a simple commensal of the human gastrointestinal tract to become one of the leading causes of nosocomial infection. The emergence of *E. faecium* as a nosocomial pathogen has coincided with the spread of a subpopulation highly adapted to hospital setting and belonging to three main lineages: ST17, ST18 and ST 78. This subpopulation is characterized by resistance to many antibiotics such as ampicillin, levofloxacin and eventually also vancomycin. In addition, clones belonging to these lineages are enriched in some virulence determinants such as Esp<sub>Efm</sub>, Acm or Hyl<sub>Efm</sub>.

Oncohaematologic patients under chemotherapy are at a higher risk of developing infections, being this risk proportional to the intensity and duration of neutropenia. In order to reduce the incidence of infection, the administration of antibiotic prophylaxis, mainly with fluoroquinolones, has been widely used amongst these patients. In recent years, an important change in the etiology of these patients' infections has been noted worldwide: while gramnegative bacilli predominated in the 1980s, an increase in the number due to grampositive microorganisms has been reported. The main factors that seem to explain this etiological switch are the administration of more aggressive chemotherapies, the widespread use of indwelling catheters and the administration of fluoroquinolone prophylaxis. Neutropenic patients' bacteraemia has been associated with one-third of the febrile episodes and it often has an endogenous origin in the gastrointestinal tract. In recent years *E. faecium* has emerged as a main cause of nosocomial bacteraemia especially in patients with some type of immunosuppression. The ability of this microorganism to colonize and overgrow in the patient's intestine and onto different surfaces partially explains its success in the dissemination and infection development in the hospital setting. However, a comprehensive understanding of these processes dynamics and of the inherent characteristics of this microorganism that might favour the colonization/infection and transmission are needed.

### OBJECTIVES

The objectives of this work were organized in three chapters and are summarized in:

- 1) To study the **colonization dynamics**, population structure and **microbiological characteristics** of **ampicillin resistant** *E. faecium* (AREfm) in oncohematologic patients receiving levofloxacin prophylaxis and to evaluate the changes occurring in their intestinal microbiota.
- 2) To describe the **emergence** of linezolid resistance in AREfm colonization isolates from an oncohematologic patient and to characterize the molecular mechanism responsible for the resistance.
- 3) To compare the usefulness of **PhP phenotypic typing** technique with PFGE for the characterization of the population structure of colonization and clinical isolates of *E. faecium*.
- 4) To study and compare the intestinal adhesion, invasion and translocation abilities of a set of *E. faecium* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. gallolyticus*) isolates from different origin using an *in vitro* cellular model.

5) To compare the ability of *E. faecium* and *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates with different origin to form biofilms on different surfaces.

6) To **describe** and **molecularly characterize** the increase in **vancomycin-resistant *Enterococcus* (EVR)** colonization prevalence in patients admitted to a tertiary hospital with an endemic carbapenemases-producing Enterobacteriaceae (CPE) situation and measures implemented for the epidemiological control. Additionally, transmission dynamics of *E. faecium* isolates was evaluated in a group of healthy volunteers.

## RESULTS

In the **first chapter** of this thesis, it was observed that 61.5% of oncohematologic patients under levofloxacin extended prophylaxis (LEP) were colonized by AREfm during their hospital admission, mainly once levofloxacin prophylaxis was suspended (31% of AREfm acquisition occurred during this period). AREfm colonization after levofloxacin prophylaxis withdrawal (Pos-PEL phase) was significantly associated ( $p < 0.025$ ) with the chemotherapy phase, the presence of mucositis and the duration of neutropenia. A very low AREfm clonal diversity was observed (clones belonging to 24 pulsed-field types and 13 ST) and this tended to decreased during hospital admission. The great majority of the isolates (94.8%, 6/13 ST) belonged to BAPS groups 2.2a and 3.3a, previously associated with the hospital environment, and were resistant to levofloxacin, erythromycin and had streptomycin high level resistance ( $> 1000 \text{ Mg / L}$ ). During the study period, the predominance of the EfmRA-ST117-B clone (32.6% of the patients) harbouring virulence determinants such as  $\text{Esp}_{\text{Efm}}$  and  $\text{Acm}_{\text{Efm}}$  was noted. In addition this clone was able to produce bacteriocins against the vast majority of *E. faecium* clones and demonstrated the unusual ability to metabolize polyols such as sorbitol, glycerol and mannitol. This clone was, together with all clones belonging to ST-17, responsible for the persistent colonization and produced all the bacteraemic episodes detected during the study. Moreover, *E. faecium* was the third most frequent cause of bacteremia in these patients (4.4% of patients) and in all cases, EfmRA-ST117-B gut colonization was previously detected.

In a subgroup of 20 oncohaematological patients, quantitative changes occurring in the global microbial population and specifically in enterococci during their hospital stay were studied. The decrease in bacterial load was observed in 75% (decrease of 0.15-2.33 log) and 85% (decrease of 0.05- of patients during the phases of administration of prophylaxis with levofloxacin (LEP) and Pos-LEP respectively. This decrease was compensated, in patients colonized by AREfm, with a partial increase in the enterococci and particularly *E. faecium* populations.

The use of the PhP phenotypic typing technique demonstrated a good agreement with PFGE for the characterization of the population structure of *E. faecium* isolates but only when a similarity index of 0.9 was used.

The emergence of linezolid resistance in two EfmRA colonization isolates after a short treatment with this antibiotic was shown to be due to the presence of the G2576T mutation in 4 out of six 23S rRNA gene alleles.

In the **second chapter** of this thesis we studied the characteristics of the interaction (adhesion and invasion) of *E. faecium* and *S. gallolyticus* from different sources with intestinal epithelial cells and their ability to translocate across them. In addition, biofilm formation on different surfaces was evaluated. It was observed that the capacity of adhesion and invasion of the intestinal epithelium for both species was low. However, although no statistically significant differences were found ( $p = 0.43$ ), *E. faecium* isolates adhered in a higher degree

than *S. gallolyticus* did. The only isolate that showed a high capacity for invasion was Sg78, which had been isolated from a calf and had the particularity of being resistant to vancomycin. All *S. gallolyticus* isolates formed biofilms on collagen rich surfaces more efficiently than *E. faecium* isolates ( $p < 0.05$ ). In contrast, *E. faecium* isolates showed a much higher intrinsic translocation ability than *S. gallolyticus* although and significant intra-species differences were demonstrated. A bacteraemic and a colonization isolate (Efm106-ST18 and Efm-ST121-ST117) from oncohematological patients were the most efficient ones in translocating ( $p < 0.05$ ).

Finally, **in the third chapter** of this thesis we described the detection and characterization of a VRE hidden outbreak in a third level hospital thanks to the existence of an active surveillance system for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteria. It was shown that all colonization and infection isolates but one ( $n = 54$ ), resistance to vancomycin was encoded in the Tn1546 transposon and was due to the presence of vanA genotype. The domination of clone VRE-ST17 was observed although four minor clones (VRE-ST117- (B-E)) were also detected. Index cases were thought to occur in the Internal Medicine and Nephrology wards six months in advance to outbreak detection. The study of finger-to-finger transmission of two vancomycin susceptible *E. faecium* strains (*E. faecium*-L50-ST178 and *E. faecium* ST117) showed important inter-individual differences.

## CONCLUSIONS

It has been shown that oncohematologic patients undergoing chemotherapy have a marked reduction in the density of their intestinal microbiota, being particularly remarkable after the discontinuation of LEP. Nearly two-thirds of these patients were persistently colonized by AREfm hospital clones. These clones were, in all cases, responsible for the bacteraemic episodes recorded during the study. The predominance of the EfmRA-ST117-B clone in our institution might be due not only to the presence of resistance determinants, but also to the presence of virulence determinants ( $\text{Esp}_{\text{Efm}}$ ,  $\text{Hyl}_{\text{Efm}}$ ,  $\text{Acm}$ ), bacteriocin production and the additional ability to metabolize polyols. The increase in the number of AREfm bacteriemias may be due to its ability to translocate using the paracellular way, despite having a low adhesion capacity. The high ability of *S. gallolyticus* isolates to form biofilms on collagen coated surfaces has been proved. Finally, a silent outbreak of VRE has been detected and characterized in a tertiary hospital with a very low prevalence ( $< 0.5\%$ ) of VRE. This was mainly achieved thanks to the existence of an epidemiological surveillance system. Additionally the existence of a high inter-individual variability in *E. faecium* transmission was demonstrated.





# INTRODUCCIÓN

---



## 1. El género *Enterococcus*

El género *Enterococcus* está formado por un conjunto de bacterias grampositivas con bajo contenido en G+C (37-45% mol), que son, en su mayoría, comensales del tracto gastrointestinal (TGI) animal y humano. Sin embargo, son bacterias muy ubicuas que pueden colonizar nichos muy diversos como el suelo, agua, plantas y productos alimentarios como la carne cruda o derivados lácteos [1–3].

### 1.1. Perspectiva histórica

El origen del término “enterococcus” se remonta a finales del siglo XIX cuando Thiercelin realiza la primera descripción de unos cocos saprofitos de origen intestinal con capacidad patógena [4,5]. Dos meses después, describe un caso de diarrea aguda en la que este microorganismo predomina en el TGI del paciente y es capaz de translocar desde el intestino a sangre ocasionando un cuadro de septicemia. En ese mismo año, 1899, MacCallum y Hastings aíslan un organismo similar en las válvulas aórtica y mitral de un paciente con endocarditis aguda y realizan una descripción detallada tanto de sus características microbiológicas como de su patogenicidad [6]. Este microorganismo, al que denominan *Micrococcus zimogenes*, en la actualidad *Enterococcus faecalis*, se aisló en cultivo puro repetidamente a partir de muestras de sangre del paciente hasta su muerte por fallo cardíaco. A lo largo de los siguientes años, se suceden numerosas reseñas en la literatura describiendo el aislamiento de este mismo microorganismo tanto en muestras clínicas como fecales [7–10]. No obstante, entre tanto, Andrewes y Horder (1906), en primer lugar y Orla-Jensen en segundo (1919) emplean por primera vez los términos *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* respectivamente para hacer referencia a dos bacterias intestinales humanas, con potencial patógeno, que diferían en su patrón de fermentación de azúcares [11,12].

Estas descripciones tempranas suponen una transición en el paradigma de la patogénesis enterocócica, al cambiar su consideración de mero microorganismo comensal por la de patógeno oportunista. La aparición de enterococos multirresistentes a lo largo de los últimos 50 años no ha hecho sino agravar esta situación ya que se han convertido en una de las principales causas de infección nosocomial a nivel mundial.

En 1937 Sherman propone una nueva clasificación de los estreptococos descritos hasta la fecha en cuatro grupos: piógeno, viridans, láctico y enterococcus [13], basándose en temperaturas de crecimiento y tolerancia a altas concentraciones de sales y pH. Esta división incluye a *S. faecalis* dentro del grupo enterococos, pero no a *S. faecium*, que es considerado por el autor la misma especie, pese a haberse descrito años antes. La creación de un nuevo taxón denominado *Enterococcus*, basándose en las características fenotípicas y distribución celular de las especies, no se propuso hasta entrados los años 1970 [14]. Sin embargo, no es hasta 1984 cuando Schleifer y Kilpper-Balz, aportan evidencia suficiente para, basados en los estudios de hibridación del ADN y secuenciación del 16S rADN, proponer la transferencia de las especies *S. faecalis* y *S. faecium* a un nuevo género al que denominan *Enterococcus* [15].



En la actualidad este género, englobado dentro del Filo Firmicutes, la clase *Bacilli*, el orden *Lactobacillales* y la familia *Enterococcaceae*, cuenta con más de 50 especies (<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>). De entre ellas *E. faecalis* y *Enterococcus faecium* son las que se aíslan con mayor frecuencia en el hombre. Otras especies, como *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus casseliflavus* o *Enterococcus gallinarum* colonizan en menor medida el TGI del hombre y pueden causar, aunque con menos frecuencia, infecciones en humanos.

## 1.2. Fisiología y filogenia

Los enterococos son cocos grampositivos con forma esférica u ovoide que se disponen en parejas o cadenas cortas. Son microorganismos anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, no formadores de esporas que clásicamente se han incluido en el grupo D de la clasificación de estreptococos propuesta por Lancefield. Su temperatura óptima de crecimiento son 35°C aunque son capaces de crecer en rangos de temperatura que oscilan entre los 10-45°C [13]. Una característica diferencial con las bacterias del género *Streptococcus* es su capacidad de crecer en medios líquidos con alta concentración de sales (> 6,5% de NaCl) y de hidrolizar la esculina en presencia de sales biliares (40% p/v). Además, son especialmente resistentes a condiciones adversas lo que les permite sobrevivir en temperaturas extremas y a desinfectantes químicos como el cloro, el glutaraldehído o el alcohol [16–18], lo que les confiere una ventaja para su supervivencia y transmisión en el medio ambiente hospitalario.

Los miembros de esta especie dan negativa la reacción de la catalasa aunque se ha demostrado la presencia de una catalasa dependiente del grupo hemo en *E. faecalis* que está ausente en otras bacterias del grupo como *E. faecium*, *E. gallinarum* o *E. casseliflavus*. Algunas especies como *E. gallinarum* o *E. casseliflavus*, son móviles y otras (*E. sulfureus*, *E. casseliflavus* o *E. mundtii*) producen un pigmento de tonalidad amarilla [5,19].

Los enterococos tienen un metabolismo homofermentativo y son capaces de utilizar una gran variedad de sustratos como fuente de energía (carbohidratos complejos, glicerol, lactato, citrato, malato, aminoácidos como la arginina y algunos alfa-cetoácidos), sin embargo, tienen unos requerimientos nutricionales bastante exigentes, siendo necesarios aminoácidos y vitaminas para su óptimo crecimiento [20].

Facklam y cols. propusieron la clasificación de las especies del género *Enterococcus* en cinco grupos (I-V) basada en algunas características fenotípicas de los aislados como la hidrólisis de azúcares (manitol, sorbosa, arginina, arabinosa, sorbitol, rafinosa, metil-  $\alpha$ -D-glucopiranosido y sacarosa, motilidad y pigmentación) [5,21]. Recientemente Lebreton y cols. añadieron un nuevo grupo (VI) en el que incluyeron a la especie *Enterococcus ureilyticus*, previamente excluido de esta clasificación al no poderse asociar a ninguno de los grupos descritos [5]. Esta clasificación, útil con fines diagnósticos o ecológicos, no lo es tanto a la hora de establecer la relación evolutiva entre las distintas especies de *Enterococcus*. Este hecho se debe a que las especies pertenecientes a un mismo grupo pueden tener características metabólicas idénticas o muy similares y un origen muy diverso, como se ha demostrado mediante análisis filogenéticos basados en la secuenciación del gen 16S rARN.

Algunas de las rutas metabólicas principales de ciertos enterococos (ej: genes implicados en el metabolismo de la rafinosa codificados en un megaplásmido de *E. faecium*) pueden estar codificadas en plásmidos, lo que podría favorecer su supervivencia en diferentes ambientes con un reducido aporte de nutrientes [22]. Esto podría indicar que la adquisición de determinados nutrientes del propio hábitat (ej: dieta del hospedador o relaciones cruzadas alimentarias con otros microorganismos del consorcio intestinal) supone una ventaja adaptativa con respecto a la posesión de genes necesarios para su biosíntesis y han contribuido, en parte, a la reducción de su genoma. La alta adaptación de los enterococos al competitivo medio gastrointestinal a lo largo de millones de años de co-evolución apoyan esta teoría [20].

### **1.3. Ecología: colonización del tracto gastrointestinal**

#### **1.3.1. Ecosistema microbiano intestinal**

El TGI se encuentra colonizado por comunidades microbianas que en su conjunto constituyen la denominada “microbiota normal”. La mayoría de los integrantes de esta microbiota pertenecen al dominio Bacteria, aunque también existen, en menor medida, representantes del dominio Archaea, Eukarya, además de virus y bacteriófagos [23]. Dentro del dominio Bacteria, los filos Bacteroidetes y Firmicutes son los más abundantes y otros como Acidobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria o Lentisphaerae se encuentran menos representados [24]. La composición real de esta microbiota varía considerablemente entre individuos y se ve sometida a cambios importantes a lo largo de la vida de éste. Son innumerables los factores que condicionan o pueden alterar la distribución de especies bacterianas en la microbiota intestinal. Estos pueden ser dependientes del propio hospedador, como la edad, la dieta o el estado inmunológico; o factores externos como la administración de tratamientos antibióticos o citotóxicos o procesos patológicos como enfermedades intestinales o diarrea [25–29]. La microbiota intestinal desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas, tróficas y defensivas. Entre las primeras destaca la producción de ácidos grasos de cadena corta o vitamina K y entre las tróficas, su control sobre la proliferación-diferenciación epitelial intestinal. Sin embargo, quizá una de las más importantes sea su papel en la resistencia frente a la colonización por microorganismos ajenos a ella [30].

Clásicamente el estudio de la composición de esta microbiota se realizó por técnicas dependientes de cultivo, que sobreestimaron el papel de los microorganismos cultivables. Sin embargo, la mayoría de las especies que componen la microbiota son difíciles de cultivar en el laboratorio, bien por sus requerimientos nutricionales o por su alta adaptación al nicho ecológico. Más recientemente, el estudio metagenómico de la microbiota intestinal mediante “*Next generation sequencing*”, en su mayoría basados en 16s rADN, han proporcionado una gran cantidad de información acerca del contenido genético de las bacterias que colonizan el TGI (metagenoma intestinal humano), la mayoría no descritas previamente, y de cómo varía su composición en distintas etapas de la vida o en procesos patológicos [25,29,31].

El intestino de un individuo sano puede contener entre 500-1.000 especies bacterianas distintas, sin embargo, la diversidad bacteriana intestinal, en particular de las especies minoritarias, se desconoce con exactitud [32]. Como se indicó arriba, la distribución de estas especies varía con la localización anatómica del aparato digestivo, principalmente debido a cambios en el pH de los compartimentos y al distinto aporte de oxígeno y de nutrientes. Así, el intestino delgado contiene sólo un limitado número de especies confinadas a la parte más distal, entre las que se encuentran *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterobacteriaceae* o *Candida* spp, entre otros. Este número tan reducido de bacterias en la parte alta del TGI se debe al pH ácido del medio luminal y al propio peristaltismo, que impiden el establecimiento de bacterias a este nivel. Por el contrario, el intestino grueso contiene un ecosistema microbiano complejo y dinámico con concentraciones bacterianas que oscilan entre  $10^9$ - $10^{12}$  bacterias/g de contenido luminal y en el que predominan los microorganismos anaerobios (100-1.000 veces más abundantes que las bacterias aerobias). Entre los principales géneros de bacterias gramnegativas destacan *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Prevotella*; mientras que de grampositivos predominan los géneros *Bifidobacterium*, *Actinomyces*, *Clostridium*, *Ruminococcus* o *Peptostreptococcus* entre otros [33]. En menor medida (en orden  $10^6$ - $10^7$ ) se encuentran los anaerobios facultativos como las enterobacterias (principalmente *E. coli*), *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. o *Lactobacillus* spp.

Los enterococos constituyen una población minoritaria (<1% en yeyuno e íleon y en torno al 1% en el colon) dentro de la microbiota intestinal. En el ser humano, colonizan de manera temprana el TGI, detectándose ya en los primeros días tras el nacimiento. En la mayoría de estudios, *E. faecalis* es la especie más frecuentemente detectada en el TGI (~50% de todos los enterococos) seguida por *E. faecium*. La concentración de estas dos especies en las heces de un individuo sano se encuentra en el rango de  $10^5$ - $10^7$  por gramo de heces para *E. faecalis* y  $10^4$ - $10^5$  para *E. faecium* [20,34].

Durante muchos años, se consideró a los enterococos como patógenos oportunistas, ya que sólo producían infecciones de manera esporádica, principalmente en pacientes muy graves. Sin embargo, durante las últimas tres décadas *E. faecalis* y sobre todo *E. faecium* han emergido a nivel mundial como causa importante de infección nosocomial, particularmente en pacientes inmunocomprometidos [35].

Una de las características más importantes que han conducido a la emergencia de una población de *E. faecium* altamente adaptada al hospital, es su capacidad inicial de colonizar el TGI seguido de su persistencia, más que su capacidad letal. Además, algunos autores han observado que el sobrecrecimiento de determinadas poblaciones de *E. faecium* a nivel intestinal ( $10^8$ - $10^9$  UFC/ g) precede a la infección en la gran mayoría de pacientes [36].

A continuación, se describen algunas de las características que han contribuido a la emergencia de *E. faecium* como un patógeno de primera línea a nivel nosocomial.

## 2. *Enterococcus faecium*

Hasta los años 80, *E. faecium* se consideraba un mero microorganismo comensal del TGI y las infecciones en las que se documentaba su aislamiento eran minoritarias. Sin embargo, durante los últimos 30 años se ha convertido en una de las principales causas de infección en el ámbito hospitalario que suponen, además, un reto terapéutico, debido al gran número de antibióticos a los que presenta resistencia [35].

La evolución de *E. faecium* de comensal intestinal a patógeno oportunista es un proceso complejo y secuencial en el que parecen haber intervenido distintos factores, como la adquisición de determinantes de resistencia, virulencia y persistencia. Su expresión supone una ventaja adaptativa ya que facilitan, por un lado, la colonización de distintos epitelios (urinario, oral o intestinal) y por otro, su adhesión a una gran variedad de proteínas de la matriz extracelular. A continuación, se detallan los más importantes, caracterizados hasta la fecha.

### 2.1. Factores asociados a virulencia y persistencia

La capacidad de *E. faecium* de colonizar, persistir y producir infección en distintos huéspedes se ha visto potenciada, entre otros factores, por su capacidad de producir bacteriocinas, proteínas de adhesión a la matriz extracelular o de crecer en biopelículas.

#### 2.1.1. Determinantes de la superficie celular

Los determinantes de la superficie celular son proteínas que contribuyen a la colonización del TGI humano bien por acción directa o por intervención en el proceso de formación de biopelículas (tabla 1).

La proteína de superficie enterocócica (Esp<sub>Efm</sub>), está codificada por genes adquiridos como parte de una isla de patogenicidad [37] y su expresión se ha demostrado importante en la formación de biopelículas y adherencia a células del epitelio urinario [38,39]. Esta proteína se encuentra ampliamente distribuida en aislados clínicos de *E. faecium*, lo que apoya su papel en la virulencia de este microorganismo [40].

**Tabla 1.** Factores asociados a virulencia en *E. faecium* (modificado de Sava y cols., 2010).

Factor	Fisiopatología/virulencia	Epidemiología	Referencias
Esp	Formación de biofilm	Vinculado a <i>E. faecium</i> asociado al hospital	Heikens y cols., 2007 Leendertse y cols., 2009
	Patogénesis de endocarditis en rata		
	Patogénesis ITU en ratón		
	Antigénica en humanos durante endocarditis y bacteriemia		
Acm	Unión a colágeno tipo I y IV	Ampliamente distribuido en <i>E. faecium</i>	Hendrick y cols., 2008 Nallapareddy y cols., 2008
	Patogénesis de endocarditis en rata		
	Antigénica en humanos durante endocarditis		
Pili			
PilA	Desconocido	Ampliamente distribuido en <i>E. faecium</i>	Hendrickx y cols., 2008
PilB			
Scm	Unión a colágeno tipo V	Ampliamente distribuido en <i>E. faecium</i>	Sillanpää J y cols. 2004
EcbA	Unión a colágeno tipo V	Vinculado a <i>E. faecium</i> asociado al hospital	Hendrickx y cols., 2009
	Unión a fibrinógeno		

Abreviaturas: Esp, proteína de superficie enterocócica; Acm, adhesina de unión a colágeno de *E. faecium*; Scm, segunda adhesina de colágeno de *E. faecium*; EcbA, proteína A de unión a colágeno de *E. faecium*; ITU, infección de tracto urinario.

Bajo el nombre de “componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de la matriz extraceular”, del inglés MSCRAMMs, se engloban una serie de proteínas que interaccionan de manera específica con otras proteínas de la matriz extracelular y que son importantes en fases tempranas de la infección. Aunque se han descrito más de 15, las proteínas de unión a colágeno, Acm, EcbA y Scm son las mejor caracterizadas. Las dos primeras contribuyen a la patogénesis experimental de la endocarditis y se detectan mayoritariamente en *E. faecium* asociados al hospital [41–45].

Las proteínas PilA y PilB, están implicadas en la formación del pili en *E. faecium*, y aunque su papel en la virulencia no está completamente esclarecido, su similitud estructural con los genes del cluster *ebp* de *E. faecalis*, sugieren una posible implicación en la adhesión al hospedador [41,42,46].

### 2.1.2. Otros elementos

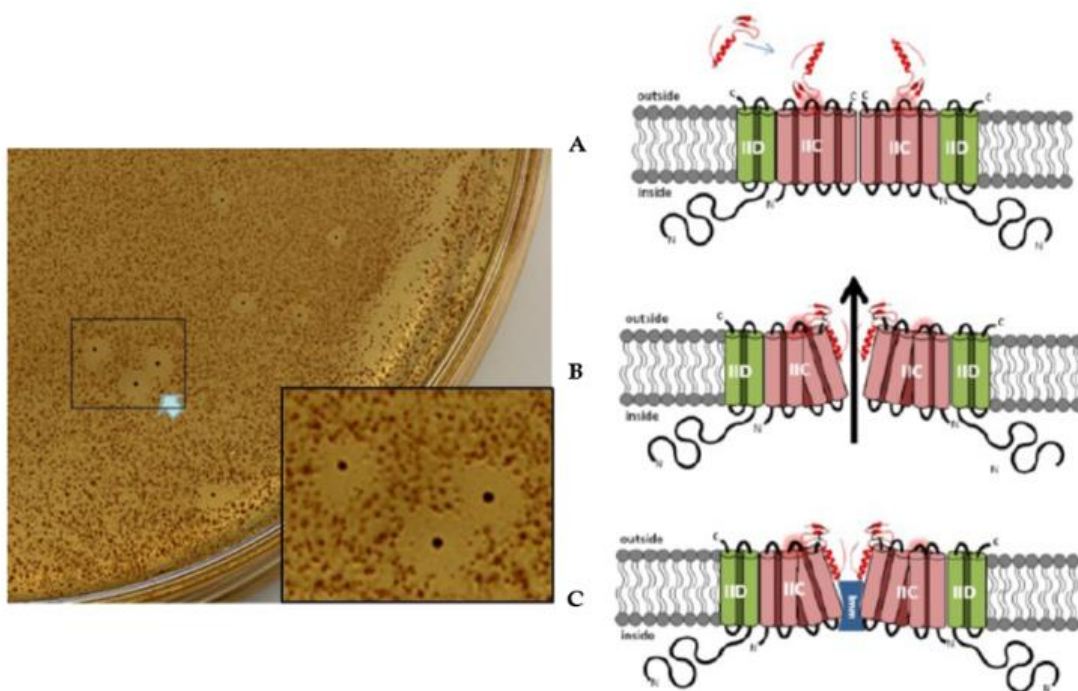
La presencia de otros elementos, como grandes plásmidos transferibles o megaplásmidos (> 150 kb) son comunes en aislados clínicos de *E. faecium* y parecen tener un papel en la virulencia [47]. Con frecuencia contienen genes implicados en el metabolismo de distintos carbohidratos, como el gen *hyl<sub>Efm</sub>*. Inicialmente se sugirió, erróneamente, que este gen codificaba para un hialuronidasa [48]. Sin embargo, estudios más recientes de secuenciación han demostrado que, en realidad, codifica para una glicosiltransferasa que permite la utilización de carbohidratos complejos [49,50]. Además, se ha comprobado que la transferencia de estos plásmidos a cepas comensales de *E. faecium* que no los contienen, incrementa tanto su virulencia (en un modelo experimental de peritonitis) como su capacidad de colonización gastrointestinal [51,52].

### 2.1.3. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son pequeños péptidos, sintetizados como pre-péptidos, que se liberan al exterior celular y que tienen capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias relacionadas. Las bacteriocinas de las bacterias grampositivas pueden pertenecer a dos clases diferentes de péptidos estables al calor, la clase I o lantibióticos (contienen aminoácidos como lantionina, metilalantionina, dehidroalanina o ácido 2-aminoisobutírico), o la clase II o no lantibióticos. Ambas presentan una gran diversidad en cuanto a estructura, espectro y modo de acción y secreción [53].

La mayoría de las bacteriocinas producidas por los enterococos pertenecen a la clase II y tienen actividad frente a *Listeria* spp., *Clostridium* spp. y *Staphylococcus aureus* [53,54]. En *E. faecium* se han caracterizado un gran número hasta la fecha (Bac43, Bac32, EntL50a/EntL50b, EntQ, EntA, EntB y EntP). La producción de estos compuestos puede suponer una ventaja en el establecimiento de poblaciones de *E. faecium* a nivel intestinal, ayudándole a competir por el nicho ecológico.

Se ha propuesto que el efecto bactericida que ejercen las bacteriocinas de enterococos (clase IIa) se deba a la permeabilización de la membrana celular. Los péptidos, al entrar en contacto con la membrana celular forman una estructura helicoidal que se incorpora dentro de la misma generando un poro. Este mecanismo de acción, caracterizado inicialmente para la enterocina P, induce la fuga de iones K<sup>+</sup>, la despolarización de la membrana y en última instancia la muerte celular [55] (figura 1).



**Figura 1.** Producción de bacteriocinas en una muestra fecal de un bebé de 6 meses y mecanismo de acción propuesto para una bacteriocina de clase II. En la imagen de la izquierda las flechas indican la zona de inhibición de crecimiento debido a la producción de bacteriocinas por enterococos presentes en las heces. En la imagen de la derecha se representa cómo las bacteriocinas se unen a la membrana celular de otras bacterias haciendo que un canal tipo permeasa se mantenga abierto. Esto conduce a la fuga de electrolitos y destrucción de la integridad de la membrana (A y B). En la imagen C se muestra como, en la bacteria productora, una proteína de inmunidad se une a uno de los dominios transmembrana de la proteasa, impidiendo la apertura del poro por la bacteriocina.

Las cepas productoras de bacteriocinas se han aislado de ambientes muy diversos, pero parecen ser más comunes en muestras procedentes de alimentos (quesos, carnes, pescados y verduras), así como en el TGI de animales y humanos. Algunos aislados tanto de *E. faecium* como de *E. faecalis* se han empleado durante más de 20 años en la industria alimentaria como agentes preservantes y de manera más reciente como probióticos, tratando de evitar el sobrecrecimiento de patógenos en el TGI [56].

#### 2.1.4. Formación de biopelículas

Las biopelículas son comunidades bacterianas organizadas, embebidas en una matriz extracelular polimérica, que se originan como resultado de la adherencia de microorganismos en fase planctónica a una superficie vital o inerte. La matriz extracelular que los envuelve constituye un 85% del total de la biomasa y está formada fundamentalmente por exopolisacáridos, ADN extracelular, polipéptidos y productos derivados de la lisis bacteriana y dificulta la entrada tanto de antibióticos como de células del sistema inmune[57].



El verdadero papel que desempeñan las biopelículas en la emergencia de *E. faecium* como patógeno oportunista se desconoce con exactitud en la actualidad. De hecho, y a diferencia de *E. faecalis*, apenas existen trabajos que expliquen el repertorio genético y el proceso que facilita el crecimiento de las células bacterianas en biopelículas y la mayoría de los existentes se han realizado *in vitro* sobre superficies de poliestireno [58]. Sin embargo, la importancia de este proceso en la colonización de catéteres y otros dispositivos implantables, así como en la patogenia de infecciones como la endocarditis o la infección urinaria han conducido a un aumento del interés por su estudio.

Como resultado de los estudios llevados a cabo en las dos últimas décadas se ha avanzado mucho en la identificación de determinantes enterocócicos implicados en la formación de biopelículas. En *E. faecium* los mejor caracterizados son la proteína Esp, Acm o PilB, descritos arriba. Con respecto al primero, varios trabajos han correlacionado los niveles de expresión de Esp en la superficie bacteriana con la adherencia inicial al sustrato y la posterior formación de biopelículas [37,59].

## 2.2. Resistencia antibiótica

La resistencia a los antibióticos tiene un papel relevante en la mayoría de nichos ecológicos en los que *E. faecium* habita de manera natural, en particular, el TGI. Como parte de la microbiota comensal de este tracto, las poblaciones de *E. faecium* intestinales, pueden verse expuestas a una infinidad de antibióticos durante un tratamiento médico en el curso de un ingreso hospitalario. En este contexto, la resistencia antibiótica desempeña un papel fundamental en la dinámica ecológica que tiene lugar durante, y una vez finalizado el tratamiento, ya que puede facilitar el sobrecrecimiento y selección de una población resistente, en detrimento de poblaciones sensibles a estos antimicrobianos. En el caso particular de *E. faecium*, su resistencia intrínseca a varias familias importantes de antibióticos (ej:  $\beta$ -lactámicos y aminoglicosidos) y la adquisición de resistencia a distintos antibióticos de uso clínico por parte de esta especie ha facilitado la emergencia de este patógeno a nivel nosocomial.

Además, la resistencia adquirida a la mayoría de los antibióticos usados en la terapia frente a *E. faecium* ha llevado a que el CDC declare esta especie bacteria un problema de salud pública (<https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>). La importancia clínica de la resistencia es mayor en el caso de los  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y glucopéptidos, por constituir las principales opciones terapéuticas disponibles ante infecciones graves producidas por este microorganismo.

### 2.2.1. Tipos de resistencia

*E. faecium* tiene y puede adquirir la gran mayoría de mecanismos de resistencia descritos hasta la fecha para el género *Enterococcus*. Así, la resistencia a los antibióticos en el género *Enterococcus* puede ser de dos tipos: resistencia intrínseca y adquirida (figura 2).

La **resistencia intrínseca** se define como una propiedad inherente a los miembros de una determinada especie que los hace insensibles a la acción de un determinado antimicrobiano. Está codificada por determinantes genéticos cromosómicos y se debe, bien a la ausencia de una diana farmacológica o bien a la penetración insuficiente del fármaco en el lugar de acción intracelular. El ejemplo más característico son las cefalosporinas, a las que los enterococos presentan resistencia por carecer de proteínas de unión a penicilinas (PBPs) que se unan con alta afinidad a ellas [60]. De igual manera, los enterococos presentan resistencia de bajo nivel a aminoglucósidos, debido a la incapacidad de estas moléculas tan grandes y polares de acceder al interior celular.

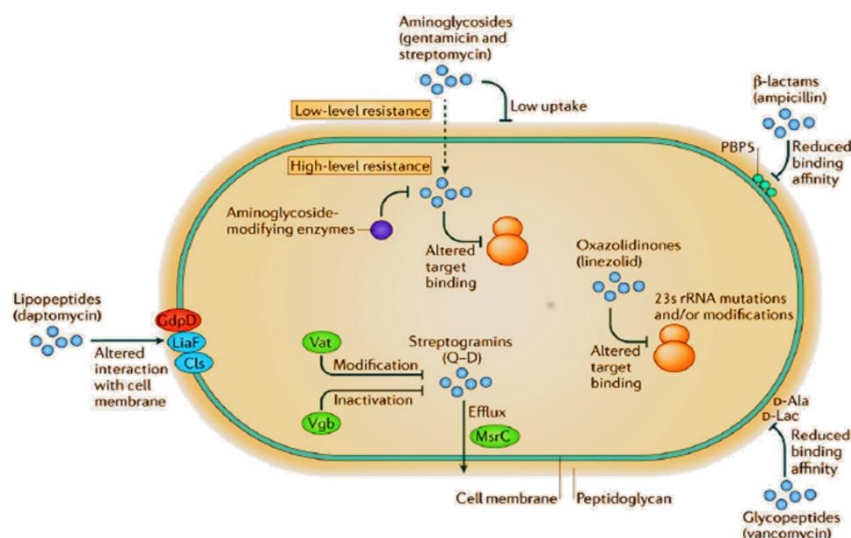
La **resistencia adquirida** se debe bien a la aparición de mutaciones a nivel cromosómico o bien a la adquisición de elementos genéticos como plásmidos o transposones que codifican para genes de resistencia a diferentes antibióticos [61]. Este tipo reviste especial importancia en la emergencia de cepas multirresistentes a nivel hospitalario. En *E. faecium* se han identificado una amplia variedad de transposones y plásmidos que confieren resistencia a casi todas las familias de antibióticos (aminoglucósidos, macrólidos, glucopéptidos,  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, oxazolidinonas, lincosamidas, estreptograminas, lipopéptidos y gliciliclinas) [62].

Existe un fenómeno adicional conocido con el nombre de **tolerancia** que se define como la capacidad de un determinado microorganismo de resistir la acción bactericida de un antibiótico cuando éste se encuentra en niveles inferiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se debe a la existencia de una población de células microbianas, genéticamente diferentes, que se encuentran en un estado transitorio de no división y que no mueren o lo hacen muy lentamente. Genéticamente se explica por la presencia de mutaciones en los genes que regulan la activación final de las autolisinas o murein-hidrolasas, que tienen una acción letal para la bacteria. El antimicrobiano pierde su actividad bactericida pero mantiene su actividad bacteriostática ya que la diana farmacológica no se ve afectada sino la lisis celular [63].

Los enterococos son tolerantes a la acción bactericida normal de los agentes activos de pared, principalmente los  $\beta$ -lactámicos y los glucopéptidos. Sin embargo, ésta puede salvarse mediante la combinación de estos antibióticos con un aminoglucósido. El mecanismo por el cual se produce esta sinergia entre ambos antibióticos se desconoce, pero los resultados *in vitro* demuestran la entrada al interior celular de una mayor cantidad de aminoglucósido que podría deberse al aumento de captación promovido por los agentes activos de pared. La combinación sinérgica de estos antibióticos se emplea con frecuencia en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones graves como endocarditis o bacteriemia en los que la monoterapia no garantizaría un efecto bactericida [64].



	Antibiótico	Especie	Mecanismo de resistencia
<b>Resistencia intrínseca</b>	β-lactámicos		
	-Penicilinas (bajo nivel)		
	-Carbapenems (nivel moderado)	Todos los enterococos	Proteínas de unión a penicilina (PBPs) de baja afinidad
	-Cefalosporinas (alto nivel)		
	Aminoglucósidos (bajo nivel)	Todos los enterococos	Captación ineficiente
	Aminoglucósidos (nivel moderado)	<i>E. faecium</i>	Producción cromosómica de la enzima AA(6')li
	Lincosamidas y estreptograminas A	<i>E. faecalis</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	Sistemas de expulsión
<b>Resistencia adquirida</b>	Glucopéptidos (bajo nivel)	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	Precusores de PG con terminación D-Ala-D-Ser
	Ampicilina (alto nivel)	<i>E. faecium</i> , <i>E. hiriae</i> <i>E. faecalis</i>	Hiperproducción o mutación de PBP5 β-lactamasa (infrecuente)
	Aminoglucósidos (alto nivel)	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	Enzimas modificantes de aminoglucósidos
	Macrólidos	Mayoría de enterococos	Metilación ribosomal
	Tetraciclina	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Modificación de proteínas ribosomales
	Quinolonas	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Modificación de la ADN girasa y Topoisomerasa IV
	Glucopéptidos (alto nivel)	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Modificación de la síntesis de precursores de PG
	Oxazolidinonas	<i>E. faecium</i>	Mutación/metilación del gen 23S rARN



**Figura 2.** Principales mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida descritos para las especies del género *Enterococcus* (modificado de Top y cols.,2007; Arias y cols. [47,65]). Abreviaturas: PG, peptidoglicano.

### 2.2.2. Mecanismos moleculares de resistencia

A continuación, se describen los mecanismos de resistencia de *E. faecium* a los principales antibióticos con utilidad clínica:

#### Antibióticos que actúan sobre la pared celular

##### β- lactámicos

Los antibióticos β- lactámicos bloquean la síntesis del peptidoglicano al actuar como inhibidores suicidas de las D, D-transpeptidasas (también conocidas como PBPs) que catalizan el entrecruzamiento de las cadenas laterales (pentapéptido) durante la síntesis del peptidoglicano. En enterococos se han descrito más de 5 tipos diferentes de PBPs. Como se

avanzó más arriba, todos los enterococos presentan una resistencia natural a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que varía con la clase estructural del mismo. De manera que las penicilinas, principalmente ampicilina, son las que muestran una mayor actividad seguidas de los carbapenems y las cefalosporinas en último lugar. Tanto es así, que las cefalosporinas no sólo son completamente inefectivas para el tratamiento de infecciones enterocócicas sino que constituyen un factor de riesgo para desarrollar una infección por estos microorganismos [19,64,66].

La resistencia de alto nivel a  $\beta$ -lactámicos en *E. faecium* se debe principalmente a la hiperproducción o mutación de los genes que codifican para la PBP5, enzima con una baja afinidad intrínseca por las penicilinas [67–69]. Cuando la resistencia a penicilinas se debe a mutaciones, se producen substituciones aminoacídicas cerca del centro activo de las PBPs que justifican la disminución de la afinidad del antibiótico a la PBP y el aumento de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos. En *E. faecium* se han descrito dos grupos bien diferenciados de PBP5, basados en su secuencia aminoacídica: uno que confiere alto nivel de resistencia a ampicilina (denominado PBP-5-R), asociado al hospital y otro generalmente asociado a la comunidad (PBP-5-S), con CMIs mucho menores a ampicilina (<64 mg/L) [64].

De manera excepcional, se ha descrito en cepas de *E. faecium* aisladas en EE. UU., la producción de una  $\beta$ -lactamasa semejante a la  $\beta$ -lactamasa estafilocócica de clase A codificada por el gen *blaZ* (>95% homología). A diferencia de ésta, la detectada en cepas de *E. faecium* se expresa en un nivel menor y de manera constitutiva, lo que puede dificultar su detección en el laboratorio debido a un importante efecto inóculo [70].

Se han identificado otros mecanismos de menor importancia que pueden conferir resistencia a este grupo de antibióticos. Este es el caso de la L, D-transpeptidasa detectada *in vitro* y codificada por el gen *ldt<sub>Efm</sub>*, que utiliza un tetrapéptido como sustrato en lugar del clásico pentapéptido. Se ha postulado que esta enzima pueda estar involucrada en el mantenimiento del peptidoglicano durante la fase estacionaria de crecimiento [71]. Recientemente se han identificado otros genes que pueden estar relacionados con la resistencia a ampicilina como *ddcP* (que codifica para una D-Ala-D-Ala-carboxipeptidasa), *pgt* (que parece codificar para una glicosil transferasa de la familia de proteínas del grupo 2) y *lytG* (una exo-glucosaminidasa que puede comportarse como una hidrolasa del peptidoglicano) [72].

## Glicopéptidos

Los glucopéptidos son una familia de antibióticos que se unen con alta afinidad al extremo D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala) de los precursores del peptidoglicano en la membrana externa, bloqueando principalmente el entrecruzamiento de cadenas nacientes del peptidoglicano (transpeptidación) y por tanto la síntesis de la pared celular [73]. Los principales representantes del grupo son la vancomicina y la teicoplanina, aunque en los últimos años se han desarrollado y comercializado nuevos compuestos relacionados denominados glicolipopéptidos, como la telavancina, oritavancina, dalbavancina, que se abordarán más adelante en el apartado de tratamiento de esta introducción.

El fundamento bioquímico de la resistencia radica en la modificación de la diana farmacológica al sintetizarse precursores de peptidoglicano cuyos aminoácidos terminales son D-Ala-D-Lac o D-Ala-D-Ser, en lugar del precursor nativo D-Ala-D-Ala. Estos precursores alterados siguen sirviendo como sustratos para la síntesis de la pared celular pero los cambios aminoacídicos determinan una disminución en la afinidad por los glucopéptidos de aproximadamente 7 veces, en el caso de la terminación D-Ala-D-Ser (bajo nivel de resistencia), y de hasta 1000 veces cuando la terminación es D-Ala-D-Lac. En este último caso, la sustitución de D-Ala por D-Lac supone la eliminación de uno de los 5 puentes de hidrógeno necesarios para la unión de la vancomicina al peptidoglicano [74] (figura 3).

La capacidad de sintetizar estos precursores alternativos está codificada en operones que, generalmente, se encuentran contenidos en elementos genéticos móviles. Sin embargo, en otras especies diferentes a *E. faecium* (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*), la resistencia a los glucopéptidos puede ser de codificación cromosómica, como parte del genoma core de estas especies por lo que se dicen intrínsecamente resistentes a glucopéptidos. Hasta la fecha se han descrito en el género *Enterococcus* ocho operones distintos que confieren resistencia adquirida a glucopéptidos, nombrados en función de la ligasa para la que codifican, (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*) y uno que confiere resistencia intrínseca (*vanC*) [34,74–77], aunque sólo los genotipos *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanM* y *vanN*, se han detectado en *E. faecium*.

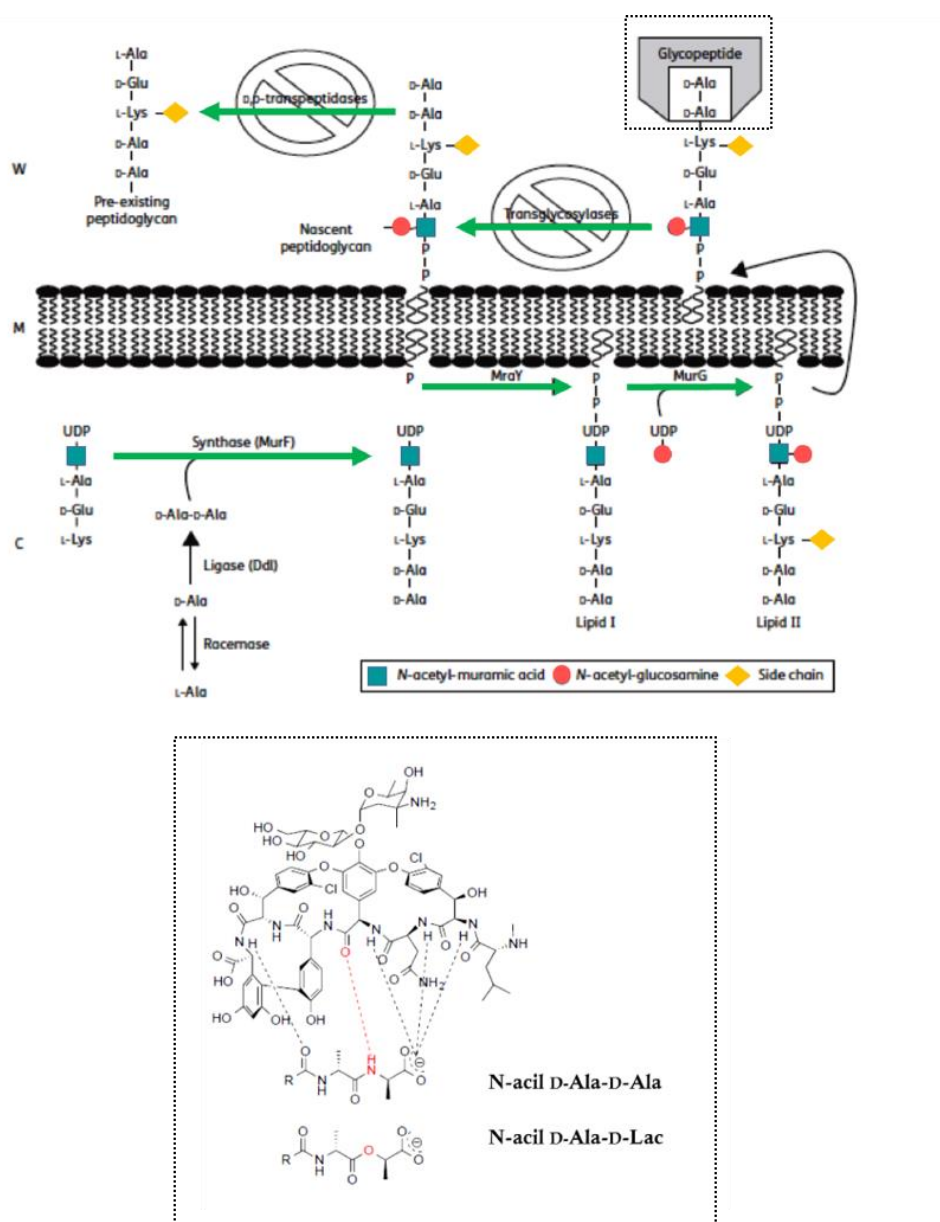
**Tabla 2.** Tipos de resistencia adquirida a glucopéptidos en el género *Enterococcus*.

Fenotipo (ligasa)	Resistencia adquirida								Resistencia intrínseca
	alto nivel		variable	moderado	bajo nivel				bajo nivel
	VanA	VanM	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanN	VanC1/C2/C3
CMI (mg/L)									
Vancomicina	16-1000	> 256	4-32 (1000)	64-128	8-32	16	8	12-16	8-16
Teicoplanina	4-512	1-96	0,5-1	4-64	0,5	0,5	< 4	0,5	< 4
Transferibilidad	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Principales especies de enterococos	<i>Efm</i> , <i>Efc</i> , <i>Edu</i> , <i>Ehi</i> , <i>Egl</i> , <i>Ecs</i> , <i>Erf</i> , <i>Eav</i> , <i>Emd</i>	<i>Efm</i>	<i>Efm</i> , <i>Efc</i> , <i>Edu</i> , <i>Egl</i>	<i>Efm</i> , <i>Efc</i> , <i>Erf</i>	<i>Efc</i>	<i>Efc</i>	<i>Efc</i>	<i>Efm</i>	<i>Egl</i> , <i>Ecs</i> , <i>Efv</i> ( <i>Efm</i> , <i>Efc</i> )
Expresión	inducible	inducible	inducible	constitutiva	inducible	inducible	inducible	constitutiva	constitutiva/inducible
Localización genética	PI/Cr	PI/Cr	Cr/PI	Cr/PI	Cr	Cr	Cr?	PI	Cr
Precursores PG	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser

Abreviaturas: CMI, concentración mínima inhibitoria; *Efm*, *E. faecium*; *Efc*, *E. faecalis*; *Edu*, *E. durans*; *Ehi*, *E. hiriae*; *Egl*, *E. gallinarum*; *Ecs*, *E. casseliflavus*; *Erf*, *E. raffinosus*; *Eav*, *E. avium*; *Emd*, *E. mundtii*; *Efv*, *E. flavescens*; PI, plasmídica, Cr, cromosómica; PG, peptidoglicano.

Los fenotipos que se han detectado más frecuentemente tanto en *E. faecium* como en el resto de enterococos son *vanA* y *vanB*, que también se han encontrado de manera esporádica en otras especies como *Corynebacterium*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* (*vanA*) y en diversas especies del género *Clostridium* (*vanB* y *vanG*) [36,78–80].

El operón *vanA* se asocia con el transposón Tn1546 (familia Tn3) de localización plasmídica y confiere alto nivel de resistencia (precursor alternativo es D-Ala-D-Lac) a vancomicina y teicoplanina. Por el contrario, el operón *vanB* suele estar contenido en un transposón conjugativo (Tn1549 o Tn5382) de localización cromosómica, aunque también puede insertarse en plásmidos conjugativos. Este genotipo confiere resistencia de moderado o alto nivel a vancomicina, pero no a teicoplanina, que es inducible por el primero, pero no por la teicoplanina (tabla 2). La estructura molecular de estos genotipos y su regulación se explicará con más detalle en el capítulo III.



**Figura 3.** Síntesis del peptidoglicano y mecanismo de acción de los glucopéptidos. La interacción de la vancomicina con el precursor nativo D-Ala-D-Ala se lleva a cabo por un puente de hidrógeno más que el precursor alternativo D-Ala-D-Lac, lo que conlleva una disminución de la afinidad.

El operón *vanC* (*vanC1*, *vanC2* y *vanC3*) se expresa de manera constitutiva en las especies *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens* y codifica para un precursor terminado en D-Ala-D-Ser, responsable de su bajo nivel de resistencia a la vancomicina y teicoplanina [74]. Recientemente este operón ha sido también identificado en *E. faecium* aislado de aguas fluviales y residuales[81].

## Daptomicina

La daptomicina pertenece al grupo de los antibióticos denominados lipopéptidos y tiene una potente acción bactericida frente a organismos grampositivos. El mecanismo de acción no se ha dilucidado completamente, pero se cree que la inserción de la daptomicina en la membrana requiere la presencia de calcio y tiene lugar de manera preferente en los septos de división. Tras la inserción, la daptomicina sufre una oligomerización y forma poros en la membrana. Esto conduce a la despolarización de la membrana por fuga de iones potasio y en última instancia a la muerte celular [82]. La oligomerización de la daptomicina en la cara externa de la membrana parece ser dependiente de fosfatidilglicerol mientras que la cardiolipina parece influir en la capacidad de estos oligómeros de acceder a la cara interna de la membrana [83,84].

La resistencia a daptomicina se ha observado en aislados clínicos de enterococos tras la administración de este antibiótico y principalmente en *E. faecium*, ya que se asocian con más frecuencia a multirresistencia y, por tanto, la daptomicina se prescribe más para estas infecciones. Hasta la fecha, los principales mecanismos de resistencia caracterizados se asocian con mutaciones en genes involucrados en la síntesis y renovación de los fosfolípidos de la membrana y parecen ser dependientes de especie [66].

En *E. faecium*, al contrario que en *E. faecalis*, la resistencia a daptomicina se ha asociado con la repulsión electrostática de ésta de la membrana celular y no tanto a la desviación de la unión a los septos de división. El estudio del genoma completo de dos cepas de *E. faecium* sensible y resistentes a daptomicina durante el tratamiento reveló cambios en ocho genes distintos [85]. De ellas se consideran más relevantes las que afectan a los genes *cfa* (que codifica para una ciclopropano sintasa involucrada en el metabolismo de fosfolípidos) [86], *cls* (codifica para una cardiolipina sintasa) y mayoritariamente a *liaFSR* (un sistema regulatorio de tres componentes que coordina la respuesta de la envoltura celular a antibióticos y péptidos antimicrobianos en bacterias grampositivas). Las mutaciones que afectan al sistema LiaFSR originan alteraciones en la actividad del sistema de señalización, pudiendo alterar las propiedades de la membrana celular de manera que la daptomicina no pueda unirse a la membrana o lo haga ineficientemente [87].

## Antibióticos que actúan sobre el ribosoma

### Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son una familia de antibióticos con actividad bactericida que bloquean la síntesis de proteínas mediante su unión al sitio A de la subunidad 30 S ribosomal. Todos los enterococos poseen intrínsecamente una resistencia de bajo nivel a los aminoglucósidos debido a la existencia de un transporte deficiente al interior de la bacteria (CMI: 4-64 g/L para la



gentamicina y 16-256 mg/L para estreptomina). Este es el motivo por el que no se utilizan en monoterapia en el tratamiento de las infecciones enterocócicas [66].

*E. faecium* posee además una enzima codificada en el cromosoma, 6'-acetiltransferasa (AAC(6')-II), con capacidad para hidrolizar la tobramicina, kanamicina y netilmicina, que le confiere un bajo nivel de resistencia [88]. Además, esta resistencia moderada a los aminoglucósidos se ve potenciada por la acción de la metiltransferasa EfmM que aumenta la resistencia a la kanamicina y tobramicina [89]. Debido a estos mecanismos, sólo la estreptomina y la gentamicina se usan de forma fiable, combinados con  $\beta$ -lactámicos en la práctica clínica.

El principal mecanismo de resistencia adquirido es la presencia de enzimas modificantes de aminoglucósidos, que confieren resistencia de alto nivel (Ran) a este grupo de antimicrobianos. Estas enzimas, generalmente adquiridas en elementos genéticos móviles, pueden ser fosfotransferasas (APH), acetiltransferasas (AAC) o nucleotidiltransferasas (ANT), en función del grupo funcional que transfieran al aminoglucósido. La presencia de alguna de estas enzimas tiene una relevancia clínica adicional, ya que anula la acción sinérgica bactericida cuando se combinan con agentes activos de pared celular, impidiendo por tanto su uso clínico. En el laboratorio su presencia se detecta bien por microdilución (estreptomina resistente > 512 mg/L, gentamicina resistente > 128 mg/L o difusión con disco (300  $\mu$ g de estreptomina, 30  $\mu$ g de gentamicina).

La resistencia a estreptomina se debe bien a cambios en la unidad 30S ribosomal (CMIs que van de 4.000-16.000 mg/L) [90] o a la inactivación enzimática por adeniltransferasas (ANT (6')-Ia y ANT(3'')-Ia) [91]. De manera semejante, la resistencia a gentamicina se debe principalmente a la acción de la enzima bifuncional AAC (6')-Ie/APH (2')-Ia, que tiene tanto actividad acetiltransferasa y fosfotransferasa, y que confiere resistencia a todos los aminoglucósidos con la excepción de la estreptomina [92]. Se han descrito otros genes que codifican para fosfotransferasas que afectan a la actividad de la gentamicina: APH (2')-Ic, que también afecta a tobramicina; APH (2')-Id con actividad hidrolítica sobre la gentamicina, pero no amikacina y APH (2')-Ib que afecta a todos los aminoglucósidos con la excepción de estreptomina y amikacina [66]. En general, salvo alguna excepción, la resistencia de alto nivel a gentamicina conlleva resistencia al resto de aminoglucósidos salvo la estreptomina y la resistencia de alto nivel a este último sólo implica resistencia a este antibiótico.

### Macrólidos, estreptograminas y lincosamidas

Los macrólidos y las lincosamidas no se utilizan para el tratamiento de las infecciones producidas por enterococos por ser éstos intrínsecamente resistentes a clindamicina y con frecuencia también a macrólidos. Por este motivo, a continuación, sólo se describe el mecanismo de resistencia a estreptograminas.

Quinupristina-dalfopristina es una combinación de las estreptograminas A (Dalfopristina) y B (quinupristina) en una proporción 70-30. Ambas inhiben la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad 50S del ribosoma, pero en dos etapas diferentes: dalfopristina bloquea la incorporación de nuevos aminoacil-tARN al sitio A y aumenta la afinidad de quinupristina por el ribosoma 10 veces y quinupristina inhibe la elongación [93]. Esta combinación de

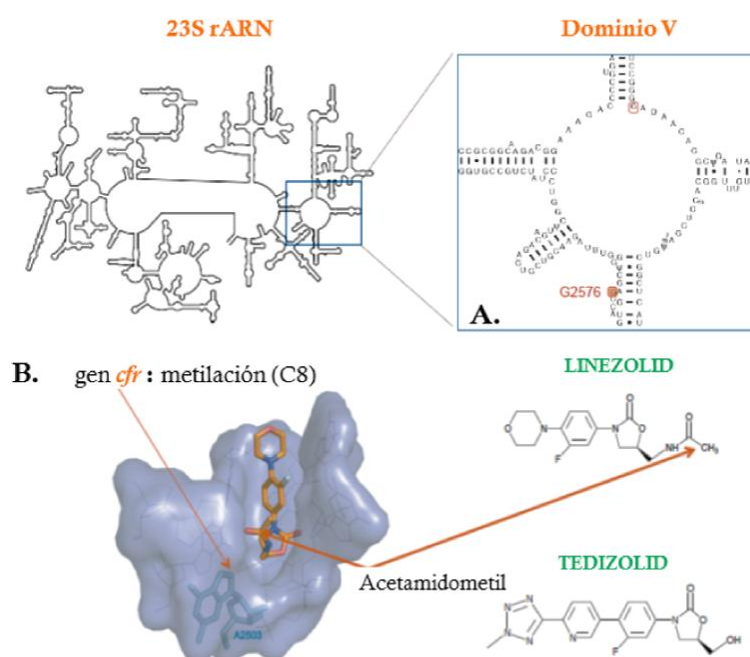
estreptograminas puede emplearse en infecciones producidas por *E. faecium*, pero no *E. faecalis*, por ser intrínsecamente resistente a la estreptogramina A.

La resistencia adquirida a esta combinación en cepas de *E. faecium* puede deberse a varios mecanismos: i) genes *vatA*, *vatD* y *vatE* que codifican para acetiltransferasas que inactivan la estreptogramina A , ii) el gen *vgbA*, cuya expresión implica la escisión enzimática del anillo lactónico de la estreptogramina B [66,94], iii) bombas de expulsión como la codificada por *msrC* , iv) mutaciones en el gen *eatA*, que codifica para un transportador tipo ABC en *Enterococcus* [95].

## Oxazolidindionas

El linezolid y el tedizolid son los dos principales representantes de esta familia de antibióticos con actividad bacteriostática. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas al impedir el correcto posicionamiento del aminoacil-tARN en el sitio A del ribosoma y por lo tanto el alargamiento de la cadena polipeptídica naciente [96].

Se han descrito varios mecanismos de resistencia adquirida a oxazolidindionas en enterococos, en su mayoría comunicados tras la administración de tratamientos de larga duración con linezolid. El mecanismo que se ha detectado con mayor frecuencia es la presencia de mutaciones puntuales en los genes que codifican el rARN, principalmente la transversión G2576T (numeración de *E. coli*) a nivel del dominio V del 23S rARN [97]. Además, se ha observado la existencia de correlación entre el número de alelos mutados del gen 23S rARN y el grado de resistencia a linezolid [98,99].



**Figura 4.** Principales mecanismos moleculares de resistencia a linezolid en *E. faecium*. A. Estructura del dominio V del 23S rARN y mutación más frecuente. B. mecanismo de acción del gen *cfr*.

Paralelamente se ha comunicado el incremento en las CMI de linezolid cuando existen mutaciones en las proteínas ribosomales L3 y L4 que rodean el centro peptidil-transferasa al que se une el linezolid. Estas mutaciones se identificaron primero en aislados de *Staphylococcus* resistentes a linezolid y posteriormente en aislados de *Enterococcus* [100].

Otro mecanismo de resistencia adquirida se debe a la presencia del gen *cfr*, que codifica para una metilasa que modifica la adenina en posición 2503 del 23S rARN. Este gen se ha asociado con la secuencia de inserción IS256 y parece tener un importante papel en la transferencia de genes de resistencia a antibióticos [101,102]. Este hecho explicaría, en parte, porqué el gen *cfr* se ha diseminado tan efectivamente entre distintas especies (*Staphylococcus*, *Clostridium* o *Enterococcus*) posibilitando su amplia diseminación en el entorno hospitalario [102–105]. La expresión de este gen no sólo afecta a la acción de las oxazolidinonas, sino que también confiere resistencia cruzada a otros antibióticos que actúan a nivel ribosomal como los fenicoles, lincosamidas, pleuromutilinas, macrólidos de 16 átomos de carbono y estreptogramina A. Sin embargo, la expresión del gen *cfr* no afecta a la acción del tedizolid, una oxazolidinona aprobada en 2014 cuyo correcto posicionamiento en el ribosoma no se ve afectado por la metilación de la A2503 [106] (figura 4).

Por último, se ha identificado recientemente un nuevo gen de resistencia a oxazolidinonas con capacidad de transferencia, el *optrA*. Este gen codifica para un transportador tipo ABC, responsable de la adquisición de resistencia a fenicoles y oxazolidinonas (incluyendo tedizolid). Hasta la fecha este gen se ha detectado casi de manera exclusiva en enterococos [107].

## Antibióticos que actúan sobre el ADN

### Quinolonas

Las quinolonas son antibióticos bactericidas que inhiben la replicación del ADN mediante unión a las topoisomerasas de tipo II (ADN girasa y la topoisomerasa IV), responsables del superenrollamiento de las hebras de ADN. Estas dos enzimas son tetrámeros constituidos por dos subunidades de GyrA y GyrB, la primera y de ParC y ParD, la segunda.

Los enterococos presentan una resistencia de bajo nivel a quinolonas y pueden adquirir resistencia de alto nivel mediante distintos mecanismos. El principal tiene lugar por mutaciones en las “regiones determinantes de resistencia a quinolonas” (del inglés QRDR) de los genes que codifican para la girasa o a topoisomerasa, principalmente *gyrA* y *parC*. Estas mutaciones evitan la unión del antibiótico a la enzima y permiten que continúe la replicación aún en presencia del antibiótico. Tanto en *E. faecalis* como en *E. faecium*, el gen *parC* es locus primario en el que se producen mutaciones, mientras que mutaciones adicionales en *gyrA* se asocian con la adquisición de alto nivel de resistencia [108–111]. En general, la mayoría de las cepas resistentes presenta mutaciones en ambos genes. Estas mutaciones originan cambios aminoacídicos que con frecuencia tienen lugar en la posición Ser83 de la ADN girasa y/o en la Ser80 de la topoisomerasa IV [112].

Se han descrito otros mecanismos minoritarios como la presencia de bombas de expulsión del tipo NorA, que son capaces de liberar al exterior celular quinolonas hidrofílicas



como ciprofloxacino o norfloxacino [113]. Sin embargo, su verdadera implicación en el desarrollo de resistencia clínica en *E. faecium* no se ha esclarecido.

### 2.2.3. Epidemiología de la resistencia: importancia de la ampicilina y vancomicina

En EE.UU. la emergencia de *E. faecium* como un importante patógeno nosocomial se empezó a documentar en la década de los 80, cuando se produjo un aumento en el número de infecciones y brotes por *E. faecium* resistente a ampicilina en los hospitales de todo el país. Este incremento no sólo tuvo una repercusión directa sobre el aumento del número de infecciones enterocócicas nosocomiales, sino que se asoció con un remplazo parcial de *E. faecalis* por *E. faecium* como causa de infección [47,114,115]. Además, se relacionó con el aumento en el consumo de cefalosporinas de amplio espectro, a las que los enterococos presentan resistencia intrínseca [116].

Una década después, se evidenció un aumento de la colonización por enterococos resistentes a la vancomicina (EVR) en pacientes hospitalizados, en primer lugar, y del número de infecciones posteriormente [65,117]. Inicialmente la diseminación se debió a la transmisión cruzada de unos pocos clones que evolucionó gradualmente a una situación policlonal, responsable de la situación endémica existente en la actualidad en los hospitales estadounidenses. En la práctica mayoría de los casos tanto de colonización como de infección, la especie predominante fue *E. faecium* [118]. Se ha sugerido que este incremento, que no se observó en la comunidad, pudiera deberse al empleo de vancomicina vía oral para el tratamiento de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en estos hospitales (4-10 veces superior que su uso por sus homólogos europeos) [64].

En Europa, por el contrario, se observó un decalaje de 10 años en el aumento de la detección de *E. faecium* resistente a ampicilina, que no se produjo hasta entrados los años 90 [119,120]. Sin embargo, y aunque el primer aislado clínico de EVR se detectó en Francia [121], la epidemiología de los EVR difiere sustancialmente con la observada en EE.UU. En el continente europeo, el aumento de EVR se detectó en un primer momento a nivel comunitario, en muestras del TGI de personas sanas y animales de granja [122–125]. De hecho, existe en la actualidad evidencia suficiente que correlaciona el empleo del glucopéptido avoparcina y la emergencia de EVR en Europa. Esta asociación condujo a la prohibición, en 1996, del uso de la avoparcina como promotor del crecimiento animal en granjas de la Unión Europea [126]. Aunque tras esta prohibición, la prevalencia de EVR en animales disminuyó notablemente, los estudios de vigilancia epidemiológica demostraron un aumento paulatino en las infecciones por EVR durante la pasada década [127].

En la actualidad más del 90% de los aislados clínicos de *E. faecium* en EE.UU. son resistentes a vancomicina y más del 80% lo son también a ampicilina. En Europa, por el contrario, la mayoría de las infecciones se deben a *E. faecium* resistente a ampicilina y sensible a vancomicina, aunque las tasas de resistencia son muy variables entre los países [65].

### 2.3. Infecciones

El papel patógeno de los enterococos se conoce desde finales del siglo XIX [4]. Sin embargo, la epidemiología de las infecciones ha variado a lo largo del pasado siglo debido a numerosos factores. Entre ellos quizá el más importante sea la introducción de un número importante de compuestos con actividad anti-enterocócica en el arsenal terapéutico, a los que estos microorganismos han ido desarrollando resistencia en mayor o menor medida.

Los enterococos pueden producir distintos tipos de infección que van desde infecciones urinarias, de piel y tejidos blandos hasta las que quizá tengan una mayor gravedad clínica como la infección abdominal, la bacteriemia y la endocarditis. Hace una década, la gran mayoría de infecciones eran debidas a *E. faecalis*. En la actualidad, en torno a un 40% de las infecciones enterocócicas se deben a *E. faecium*, lo que supone un incremento de cerca de un 10% con respecto a las producidas a principios de los años 90 [128,129]. Este aumento en el número de infecciones se asocia además con la adquisición de determinantes de resistencia a un gran número de antibióticos, complicando así el tratamiento y convirtiendo a *E. faecium* en uno de los patógenos más importantes a nivel nosocomial.

#### 2.3.1. Infección urinaria

La infección urinaria es la infección enterocócica más frecuente y suele estar confinada a las vías bajas (cistitis, prostatitis y epididimitis). Rara vez es causa de cistitis no complicada ya que en su mayoría suele producirse en varones de edad avanzada que con frecuencia se encuentran ingresados en el hospital o en una institución de larga estancia. Este hecho explica porque estas infecciones suelen estar causadas más frecuentemente por enterococos multirresistentes [130].

Las especies que se aíslan casi exclusivamente en estas infecciones son *E. faecalis* y *E. faecium*, aunque su proporción varía según las series y si se trata de unidades de críticos, donde suele predominar *E. faecium* multirresistente o de población general, donde *E. faecium* suele representar un 30% [131–134].

#### 2.3.2. Infección abdominal

Los enterococos se aíslan en el 11% de las peritonitis adquiridas en la comunidad, en el 50% de las posquirúrgicas y en cerca de un 23% de los abscesos intraabdominales, tanto de origen comunitario como nosocomial [135]. La mayoría de estos episodios tienen una naturaleza polimicrobiana (5-21%) y en ellos se ha encontrado que la presencia de *Enterococcus* pudiera contribuir a la formación de abscesos. Sin embargo, el papel patógeno real que desempeña en este tipo de infecciones no se sabe con certeza [136]. Los estudios en este tipo de infección no han encontrado un aumento significativo de la mortalidad debido al aislamiento de enterococos, salvo en pacientes de avanzada edad ingresados en unidades de críticos [136–139].

A diferencia de las peritonitis secundarias y terciarias, los enterococos pueden ser causa única de la peritonitis bacteriana espontánea o de la asociada a diálisis peritoneal. Aunque en estos casos su aislamiento es mucho menos frecuente que *Escherichia coli* en las primeras y los estafilococos coagulasa negativos en las segundas. Como en otro tipo de infecciones, el aislamiento de *E. faecium* se ha asociado con la administración previa de antibióticos, principalmente cefalosporinas y con la duración de la estancia hospitalaria [130].

### 2.3.3. Bacteriemia y endocarditis

La bacteriemia es junto con la endocarditis, la infección más importante, que pueden producir los enterococos. De hecho, en la actualidad representan la segunda causa más frecuente de bacteriemia asociada a cuidados sanitarios, un incremento desde la sexta causa en los años 80 [140].

La bacteriemia enterocócica tiene unas tasas de mortalidad que oscilan entre 26%-46% y algunos estudios han demostrado que esta es mayor cuando *E. faecium* y no *E. faecalis* es el agente etiológico. En la última década, de manera similar a lo observado en otras infecciones, se ha documentado un aumento en el número de bacteriemias producidas por *E. faecium*. Este aumento se ha documentado principalmente en pacientes con algún tipo de inmunosupresión (trasplantados u oncohematológicos, principalmente) [141–143] .

Los enterococos son responsables del 5-15% de los casos de endocarditis y representan la tercera causa más frecuente de endocarditis [144,145]. Al contrario de lo observado en las bacteriemias, esta tasa se ha mantenido más o menos estable durante los últimos años. En este caso, *E. faecalis* sigue siendo la principal especie aislada en este proceso infeccioso (cerca de un 90% de los casos) y *E. faecium* representa sólo un porcentaje menor de los casos [145].

Estas infecciones se abordarán con más detalle en el capítulo II.

### 2.3.4. Otras infecciones

Los enterococos en general y *E. faecium* en particular, causan otras infecciones de manera menos prevalente. Dentro de ellas se incluyen la meningitis, la artritis séptica y osteomielitis hematógena o la neumonía [130].

## 2.4. Tratamiento

El tratamiento de las infecciones enterocócicas es complejo debido al elevado número de antibióticos a los que presentan resistencia intrínseca (cefalosporinas, clindamicina o aminoglicósidos entre otras) y a los que pueden adquirir (ver apartado 2.2). Este hecho es más importante si cabe, en el tratamiento de las infecciones originadas por *E. faecium*.

En la elección del tratamiento influyen varios factores como i) la sensibilidad del microorganismo a compuestos  $\beta$ -lactámicos (principalmente ampicilina), aminoglucósidos y glucopéptidos; ii) si esta es monomicrobiana o polimicrobiana y iii) si existe afectación de las válvulas cardíacas u otras estructuras endovasculares [64]. Aunque no es el objetivo de este apartado revisar extensamente el tratamiento de todas las infecciones enterocócicas, se resume a continuación las bases del tratamiento.

De manera muy general y para aquellas infecciones distintas a la endocarditis, la penicilina y ampicilina siguen siendo una opción terapéutica interesante para aquellos aislados que son sensibles, principalmente las infecciones urinarias. En aquellas infecciones en las que los enterococos se aíslan como parte de una flora polimicrobiana, estas penicilinas deberían combinarse con otros antibióticos con actividad frente a gramnegativos y anaerobios. En estos casos la combinación de las mismas con un inhibidor de  $\beta$ -lactamasa (tazobactam o ácido clavulánico) es una de las alternativas más frecuentes (salvo que exista un alto riesgo de bacilos gramnegativos multirresistentes en esa área). En pacientes con alergia a antibióticos

$\beta$ -lactámicos, siempre que pueda usarse la vía intravenosa, el empleo de un glucopéptido, ya sea vancomicina o teicoplanina, podría emplearse para el tratamiento de infecciones enterocócicas no complicadas [145,146].

El tratamiento de la endocarditis suele realizarse con combinaciones de agentes activos de pared (glucopéptidos o  $\beta$ -lactámicos) y aminoglucósidos. Al contrario que para la mayoría de infecciones enterocócicas, la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos va a condicionar la elección del tratamiento ya que impide la utilización de los aminoglucósidos en combinación. Sin embargo, varios trabajos demuestran que el éxito terapéutico no varía entre cepas con alto nivel de resistencia a aminoglucósidos o sin ella [64,146].

Recientemente se han publicado varios estudios que demuestran que la combinación ampicilina y ceftriaxona en el tratamiento de la endocarditis por cepas de *E. faecalis* sin resistencia de alto nivel a aminoglucósidos es tan efectivo como las combinaciones de ampicilina con gentamicina. Sin embargo, estos resultados no son aplicables a la endocarditis por *E. faecium* [147,148].

La daptomicina, es un lipopéptido con actividad bactericida, aprobado por la EMEA en el año 2006 para el tratamiento de infecciones de piel y partes blandas por microorganismos gram-positivos, así como endocarditis/bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. Aunque no se encuentra dentro de las indicaciones de la ficha técnica, la actividad bactericida de la daptomicina justifica parcialmente que se haya administrado, generalmente en combinación, en el tratamiento de infecciones por *E. faecium* multirresistente. Sin embargo, un meta-análisis reciente revela una mayor mortalidad a los 30 días cuando se empleó daptomicina para el tratamiento de la bacteriemia por EVR en comparación a linezolid [149].

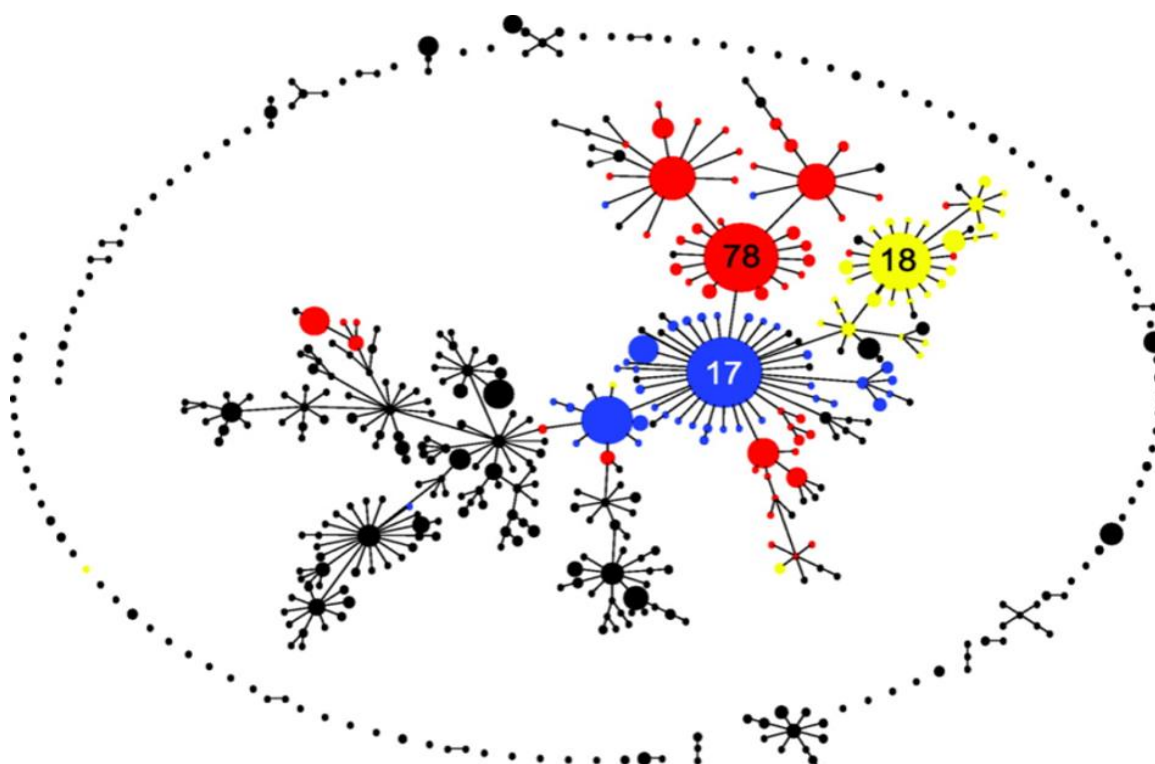
El linezolid es un antibiótico con actividad bacteriostática, con buena biodisponibilidad vía oral, que presenta actividad tanto frente a *E. faecalis* como *E. faecium* [150]. Pese a que la FDA americana aprobó el uso de linezolid para algunas infecciones por EVR y que la Asociación Americana del Corazón lo recomienda en el tratamiento de endocarditis por enterococos multirresistentes, su uso en infecciones graves es controvertido, por no tener un efecto bactericida y por la escasez de ensayos clínicos aleatorizados que apoyen su utilización. Sin embargo en un estudio del 2003 en el que evaluaron el tratamiento de la bacteriemia por EVR con linezolid, observaron tasas de curación microbiológica del 85,3% y curación clínica del 78% [151].

Por último, cabe reseñar la utilidad de una nueva familia de antibióticos, los glucolipopéptidos, entre los que se incluyen la telavancina, oritavancina y dalvabancina. Estos antibióticos inhiben la síntesis de la pared celular y producen una disrupción de su integridad. Además, son activos frente a enterococos sensibles a glucopéptidos y frente a enterococos con el fenotipo VanB (oritavancina además frente a VanA) [150,152,153]. Estos antibióticos, aprobados en distintas fechas por la EMEA para el tratamiento de las infecciones de piel y partes blandas, tienen como principal ventaja su alta semivida, lo que permite una administración semanal, útil en tratamientos largos.

## 2.5. Métodos de tipado y estructura poblacional

En los últimos 30 años se han empleado una gran variedad de métodos para establecer la estructura poblacional y evolución genética de *E. faecium*. De ellos destaca la electroforesis en campo pulsado (PFGE), basado en la macrorestricción del ADN y posterior electroforesis de los fragmentos generados, considerada hasta hace poco por muchos laboratorios, la técnica *gold standard* [154,155]. Sin embargo, y pese a su actual utilidad en el estudio de la transmisión de cepas asociadas temporal y espacialmente, se ha demostrado menos útil en los estudios epidemiológicos a largo plazo. Además, otros problemas adicionales como la falta de estandarización para la interpretación de patrones o la inconsistencia de patrones de bandas generados por los enterococos también se pusieron de manifiesto [65,156].

El desarrollo de la técnica AFLP (amplified-fragment length polymorphism) permitió establecer distintos genogrupos asociados a determinados huéspedes (cerdos, aves de corral, terneros o el hombre) y lo que es más importante, definir la existencia de dos poblaciones genéticamente diferentes: la asociada a colonización/infección en el ámbito hospitalario (C) y la perteneciente a la microbiota intestinal de personas no hospitalizadas (genogrupo A) [65,157].



**Figura 5.** Diagrama eBURST que representa la estructura poblacional de *E. faecium*. Esta figura está basada en 519 STs que representan 1749 aislados de la base de datos de MLST de *E. faecium*. Las STs pertenecientes al linaje 17 se representan en azul, las del linaje 18 en rojo y las ST del linaje 78, en amarillo. (<http://efaecium.mlst.net/>) (figura tomada de Willems y cols. 2013).

El empleo de Multi Locus Sequence Typing (MLST) y el algoritmo eBURST reveló que la mayoría de las cepas de *E. faecium* con un origen clínico o causantes de brotes hospitalarios (derivadas del hospital) formaban parte de un único Complejo Clonal (CC) al que se denominó CC17 (figura 5). Aparentemente todas las secuencias tipo (ST) de este complejo parecían descender del fundador del mismo, ST17, y eran diferentes de las aisladas en animales o en personas sanas a nivel comunitario [158]. Durante los años siguientes se sucedieron comunicaciones de muy diferentes regiones del mundo en las que se reconocía al CC17 como el complejo genético más importante de aislados asociados al hospital y se sugería su diseminación global [119,120,159–161]. La mayoría de los aislados pertenecientes a este complejo se caracterizaban por presentar resistencia a un elevado número de antibióticos (ampicilina, vancomicina, fluoroquinolonas y aminoglucósidos) y contar en su repertorio genético con numerosas secuencias de inserción, megaplásmidos y genes que codifican para factores putativos de virulencia [65,158,162].

Sin embargo, un estudio publicado por Turner y cols. en 2007 demostraron la baja precisión del algoritmo eBURST en el establecimiento de la historia evolutiva reciente en especies con alta recombinación homóloga [163]. Esto, en el caso de *E. faecium* (alto ratio recombinación/mutación) significaba que las ST agrupadas en ese gran complejo clonal no parecían tener un ancestro común y, por tanto, deberían agruparse en CC más pequeños (y las ST5, ST7, ST9, ST18, ST22, ST26, ST78 como fundadores de estos CCs) [35].

Años más tarde, el análisis de las secuencias concatenadas de los siete genes del esquema de MLST con programas como *neighbour-net tree* o *clonalframe* demostraron que el origen del CC17 era el resultado de la recombinación de grandes fragmentos cromosómicos dentro de los linajes de *E. faecium* ST17, ST18 y ST78, asociados al hospital [164,165]. Recientemente Willems y cols., empleando un modelo estadístico que tiene en cuenta tanto los patrones de recombinación como la descendencia clonal (*Bayesian Analysis of Population Structure*, BAPS) agruparon, basándose también en las secuencias concatenadas de los genes de MLST, todos los aislados de *E. faecium* cuyas secuencias se disponía hasta la fecha (1720 aislados y 519 ST), en 6 grupos de BAPS diferentes. Este estudio puso de manifiesto que la gran mayoría de aislados de origen nosocomial (80%) asociados con resistencia antibiótica se agrupaban en dos de los subgrupos descritos, BAPS 2-1 y BAPS 3-3. Por otra parte, el análisis filogenético y por eBURST de estos subgrupos verificó la existencia de tres linajes hospitalarios separados con distinto origen evolutivo: el linaje 78, correspondiente con los aislados del grupo BAPS 2-1 y los linajes 17 y 18, correspondientes a los aislados clasificados dentro el grupo BAPS 3-3. Este grupo también observó que la gran mayoría de aislados comunitarios se agrupaban dentro del grupo BAPS 1, genética y evolutivamente muy diferente de los aislados asociados al hospital, y que los aislados hospitalarios se encontraban evolutivamente más cercanos a los aislados de animales de granja [165]. Este esquema ha sido recientemente modificado por Tedim y cols. [166]

En la actualidad, la comparación de las secuencias de genomas disponibles ha permitido apoyar la existencia de dos clados, uno de cepas animales y asociadas al hospital (clado A) y otro de cepas comunitarias (clado B), que incluye aislados comensales humanos. En un estudio en el que se comparaban 100 genes del core de *E. faecium* a partir de los genomas disponibles hasta la fecha encontraron que la mayoría de estos genes se separaban en dos grupos que diferían 3,5-4% entre sí, apoyando la existencia de estos dos clados. Además, el

análisis del reloj molecular basado en la presencia de mutaciones sinónimas estimó que estos grupos divergieron entre si hace unos 300.000 año. El clado A se subdividió en A1, donde se incluyeron la gran mayoría de aislados clínicos y A2, que agrupaba la mayoría de cepas de origen animal. Se ha demostrado también que el genoma de las cepas incluidas en el clado A1 tiene un tamaño mayor que los de las cepas pertenecientes a A2 o B, lo que parece apoyar la “reciente” emergencia de este clado y la importancia de la recombinación en la misma [167].

Como ha quedado patente, el estudio de la estructura poblacional es un requisito indispensable para el control de *E. faecium* multirresistente dado que proporciona información muy valiosa acerca del proceso que ha tenido lugar en la evolución de este microorganismo.







“Entre las dificultades se encuentra la oportunidad”

Albert Einstein

## CAPÍTULO I



---

**Colonización Intestinal e Infección por *Enterococcus faecium*  
Resistente a Ampicilina en Pacientes Oncohematológicos que  
Reciben Profilaxis Extendida con Levofloxacino**



## ANTECEDENTES

### 1. Pacientes oncohematológicos

Las leucemias agudas son un grupo heterogéneo de neoplasias malignas que se originan como consecuencia de la expansión clonal de precursores hematopoyéticos (blastos) linfoides o mieloides. Se caracterizan principalmente por la acumulación de células malignas en la médula ósea, en sangre periférica y de manera ocasional, en otros tejidos. Las principales manifestaciones de las leucemias se originan como consecuencia de la infiltración de células no funcionales en la médula ósea y de la alteración del funcionamiento normal de la hematopoyesis.

La leucemia mielóide aguda (LMA) aunque puede afectar a todos los grupos de edad, tiene una mayor incidencia en los adultos, situándose la edad media de diagnóstico en torno a los 65 y 70 años. Por el contrario, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) afecta principalmente a niños y sólo cerca de un 20% de los casos se producen en los adultos (<http://www.cancer.gov/espanol>).

Los pacientes que padecen algún tipo de leucemia, tienen alterado su sistema inmune por dos motivos, la enfermedad subyacente y como consecuencia del efecto citotóxico del tratamiento quimioterápico que reciben. En este grupo de pacientes, la forma de inmunodeficiencia mejor caracterizada es la neutropenia. La aparición de neutropenia es una consecuencia del empleo de fármacos citotóxicos. Todos los fármacos citotóxicos empleados en el tratamiento, alteran la proliferación de las células hematopoyéticas, originando en un primer momento la destrucción del *pool* mitótico y en un segundo lugar, la depleción del *pool* de reserva medular. Tras esta depleción sobreviene la neutropenia [168].

La neutropenia se define como un recuento de neutrófilos inferior a 500 o a 1000/ $\mu$ l si se prevé un descenso inferior a 500/ $\mu$ l en las siguientes 48 horas [169]. Entre el 70-90% de episodios de neutropenia de más de una semana de duración, se complican con fiebre y alrededor de un 60% de estos casos, la fiebre es de origen infeccioso, siendo (Pizzo P and cols., 1989) en su mayoría de etiología bacteriana [170]. Por tanto, el control de las infecciones en estos pacientes es fundamental, puesto que suponen la principal causa de mortalidad [171].

En los pacientes neutropénicos, el riesgo de infección va a estar condicionado principalmente por la intensidad y la duración de la neutropenia [172]. La incidencia y la gravedad de la infección son inversamente proporcionales al número de neutrófilos circulantes, de manera que el riesgo de infección será considerablemente mayor en aquellos pacientes con un recuento inferior a 500 células/ $\mu$ l que en los que tengan entre 500 y 1000 células/ $\mu$ l. Se considera de bajo riesgo la neutropenia que tiene una duración inferior a 7 días, de riesgo moderado a la que dura entre 7 y 14 días y de alto riesgo a aquella que persiste más de 14 días. Los pacientes con LMA en la fase de inducción de la quimioterapia pueden presentar episodios de neutropenia de alto riesgo, que pueden durar entre 14 y 21 días.

### 2. Infecciones en el paciente neutropénico

El perfil etiológico de los procesos infecciosos en los pacientes neutropénicos ha ido variando en los últimos años. Hasta mediados de los años ochenta el 70% de las infecciones

estaban producidas por bacterias gramnegativas, mientras que desde mitad de los ochenta y hasta finales de los años noventa, se evidenció un predominio de microorganismos grampositivos [173]. Este fenómeno se ha asociado i) al uso de quimioterapias más intensivas, especialmente con arabinósido de citosina, que producen con mayor frecuencia mucositis; ii) al empleo generalizado de catéteres vasculares, así como iii) a la administración de cefalosporinas de amplio espectro, esencialmente las de tercera generación y iv) al uso profiláctico de quinolonas [171]. Desde el año 2000, sin embargo, se ha observado un nuevo incremento en las infecciones producidas por gramnegativos, probablemente en consonancia con su mayor resistencia a los antimicrobianos [174,175].

La quimioterapia es uno de los factores principales que puede facilitar el desarrollo de una infección en pacientes neutropénicos con leucemia, ya que induce cambios radicales en la piel (alopecia, alteración en la producción de sudor, descamación), en las mucosas (mucositis, alteración del pH) y en la microbiota normal (vacío ecológico y translocación bacteriana) favoreciendo la invasión, principalmente por microorganismos, comensales de la piel, de la mucosa orofaríngea y del TGI [176,177]. El empleo de catéteres se considera también un factor de riesgo puesto que supone una vía de acceso de los microorganismos al espacio intravascular a través de la interfaz catéter-piel-tejido subcutáneo o bien a través de las conexiones.

### **3. Medidas profilácticas de la infección en el paciente neutropénico**

Se han propuesto numerosas medidas preventivas para disminuir la incidencia e impacto de la infección en este grupo de pacientes que varían con el posible origen de la infección.

#### **3.1. Infección de origen exógeno**

Las primeras, van encaminadas a evitar la adquisición de patógenos exógenos y contemplan, con un nivel de evidencia científica A1, el lavado de manos tanto del personal sanitario como de los acompañantes del propio paciente [178,179]. Otras medidas, como la utilización de filtros HEPA (Guía para la prevención de la infección ambiental del CDC, 2003) en unidades con pacientes de alto riesgo, el evitar el consumo de alimentos fermentados con microorganismos vivos o la cocción de los alimentos a una temperatura superior a 65°C, se han propuesto sin estar avalados por el mismo nivel de evidencia.

#### **3.2. Infección de origen endógeno**

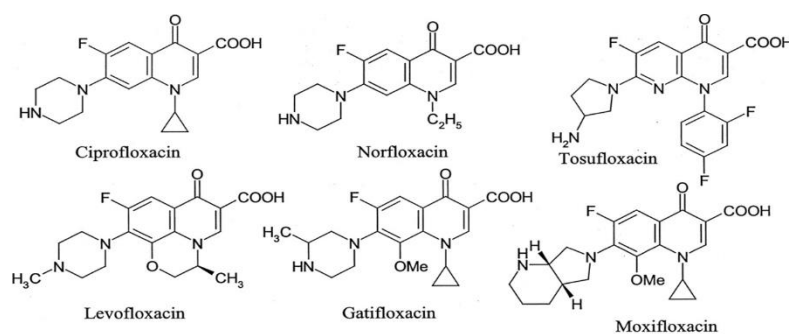
El segundo tipo de medidas tienen como fin la prevención de las infecciones de origen endógeno, eliminando para ello los microorganismos potencialmente patógenos que colonizan distintas áreas, antes de que puedan atravesar las barreras alteradas, o evitando que produzcan infección aquellos que lo consigan [180]. Este grupo engloba principalmente medidas de higiene personal y pautas de quimioprofilaxis, siendo estas últimas las más ampliamente utilizadas en la actualidad.

La profilaxis antibiótica comenzó a utilizarse tras constatar que el 80% de los patógenos que producían infección en pacientes neutropénicos tenían su origen en su propia microbiota comensal [180]. El TGI es una de las principales fuentes de infección endógenas, ya que los microorganismos pueden sufrir una translocación a través del epitelio intestinal y

diseminarse a otras localizaciones extraintestinales como los nódulos linfáticos mesentéricos, el hígado, el bazo, los riñones o la sangre [177,181,182]. Los principales mecanismos que favorecen y explican la translocación bacteriana son: (a) la alteración del equilibrio ecológico que permite el sobrecrecimiento bacteriano (pérdida de la llamada “resistencia de colonización”); (b) el incremento de la permeabilidad de la mucosa intestinal y (c) deficiencias en el sistema inmune del hospedador [181]. Estos mecanismos tienen una especial relevancia en los pacientes neutropénicos tratados con quimioterapia ya que el TGI supone en ellos, la principal fuente de infección. Por este motivo, las primeras pautas de quimioprofilaxis se basaron en la descontaminación intestinal total, utilizando combinaciones de antibióticos no absorbibles por vía oral como aminoglucósidos o vancomicina, que eliminaban la microbiota tanto aerobia como la anaerobia [183]. Sin embargo, esta profilaxis presentaba numerosos inconvenientes, asociados principalmente a la destrucción parcial de bacterias anaerobias, que desempeñan un importante papel en la prevención de la colonización/infección por otros microorganismos, y también a la selección de microorganismos resistentes.

Posteriormente, una vez conocido el importante papel de la microbiota anaerobia en la resistencia a la colonización, comenzó a emplearse la descontaminación intestinal selectiva, que tiene como finalidad la eliminación de la microbiota aerobia pero que trata de preservar intacta la anaerobia. La translocación de microorganismos anaerobios se ha descrito, pero los microorganismos no suelen diseminarse más allá de los ganglios mesentéricos y no se acompaña de morbilidad. El cotrimoxazol (trimetoprim-sulfametoxazol) fue escasamente utilizado ya que se asoció con una mayor duración de la neutropenia y con la emergencia de microorganismos resistentes, a pesar de presentar la ventaja adicional de prevenir la infección por *Pneumocystis jiroveci*. Además, se asoció con una mayor duración de la neutropenia y con la emergencia de microorganismos resistentes [184].

La introducción de las fluoroquinolonas supuso un gran avance en la quimioprofilaxis del paciente neutropénico, debido a su amplio espectro de acción y a su buena tolerabilidad. Además, a diferencia del cotrimoxazol, no producían mielosupresión y tenían una buena actividad bactericida sistémica [185] (figura 6). Desde el comienzo de su utilización, son numerosos los estudios que han demostrado una drástica reducción de la incidencia de infecciones por bacilos gramnegativos en los pacientes neutropénicos [186–190]. En un meta-análisis publicado en 2005 en el que se analizó el impacto de la quimioprofilaxis en pacientes neutropénicos afebriles, se demostró que el empleo de esta pauta frente a la no administración de fluoroquinolona o placebo disminuía la mortalidad total en un 33% y la relacionada con la infección en un 42% [191].



**Figura 6.** Estructura química de las principales fluoroquinolonas.

Uno de los principales inconvenientes del empleo profiláctico de fluoroquinolonas, es el incremento en la incidencia de las infecciones producidas por microorganismos grampositivos. La bacteriemia es, de todas las infecciones, la más estudiada en el paciente hematológico en neutropenia febril y se ha demostrado que un 29% de los episodios de neutropenia febril estaban asociados a bacteriemia [171]. Ramphal muestra en un estudio publicado en 2004, cómo la profilaxis influye en el perfil de microorganismos aislados de la sangre en pacientes neutropénicos de alto riesgo que presentan fiebre (tabla 3-modificada con estudio de Gudíol y cols., 2012) [175].

**Tabla 3.** Microorganismos aislados de muestras de hemocultivos de pacientes neutropénicos de alto riesgo con neutropenia febril (modificado de Ramphal y cols. 2004, [175]).

Estudios	Feld y cols., 2000	Winston y cols., 2001	Del Favero y cols., 2001	Cordonnier y cols., 2003	Gudíol y cols., 2013	
Años de estudio	1991-1993	1994-1996	1997-1999	2001	1991-1996	2006-2010
Administración de profilaxis (% pacientes)	SI (40)	NO	SI (90)	SI	SI	NO
Microorganismos Gram-positivos	<b>41 (44,1)</b>	<b>127 (44,4)</b>	<b>166 (66,1)</b>	<b>112 (67,1)</b>	<b>174 (64)</b>	<b>116 (41,0)</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (2,2)	14 (4,9)	14 (5,6)	14 (8,4)	10 (3,7)	14 (5,0)
SCN	11 (11,8)	44 (15,4)	110 (43,8)	52 (31,1)	81 (29,7)	50 (17,6)
<i>Streptococcus</i> spp.	26 (28,0)	41 (14,3)	31 (12,4)	34 (20,4)	77 (28,3)	29 (10,2)
<i>Enterococcus</i> spp.	1 (1,1)	14 (4,9)	5 (2,0)	6 (3,6)	10 (3,7)	26 (9,2)
Otros	1 (1,1)	14 (4,9)	6 (2,4)	6 (3,6)	8 (3,0)	4 (1,41)
Microorganismos Gram-negativos	<b>52 (55,9)</b>	<b>159 (55,6)</b>	<b>85 (33,9)</b>	<b>55 (32,9)</b>	<b>75 (27,5)</b>	<b>138 (48,7)</b>
<i>Escherichia coli</i>	20 (21,5)	63 (22,0)	41 (16,3)	30 (18,0)	50 (18,4)	71 (25,1)
<i>Klebsiella</i> spp.	13 (14,0)	39 (13,6)	4 (1,6)	--	5 (1,8)	32 (11,3)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 (6,5)	5 (1,7)	24 (9,6)	13 (7,8)	20 (7,3)	32 (11,3)
Otros	13 (14,0)	52 (18,2)	16 (6,4)	12 (7,2)	9 (3,3) <sup>a</sup>	35 (12,3) <sup>a</sup>
<b>Total</b>	<b>93</b>	<b>286</b>	<b>251</b>	<b>167</b>	<b>272</b>	<b>283</b>

<sup>a</sup>se incluyen dentro de otros los bacilos gramnegativos multirresistentes, bacilos gramnegativos no fermentadores y otras enterobacterias, pero no los microorganismos anaerobios ni las bacteriemias polimicrobianas.

De los microorganismos que han irrumpido como importantes patógenos en pacientes que reciben profilaxis con quinolonas, cabe destacar los estreptococos del grupo viridans y los estafilococos coagulasa negativos [192] y en menor medida enterococos. Con la aparición de quinolonas con un espectro ampliado frente a bacterias grampositivas como el levofloxacino, este problema se solventó parcialmente.

El levofloxacino es una fluoroquinolona que permite, por sus características farmacocinéticas, la utilización de una dosis diaria por vía oral y que muestra una excelente actividad *in vitro* frente a estreptococos, enterococos y estafilococos, manteniendo la potente actividad de las primeras quinolonas frente a gram-negativos. Además Timmers y cols demostraron en 2004 que los parámetros farmacocinéticos (concentración máxima, tiempo que se tarda en alcanzarla, área bajo la curva, volumen de distribución en el estado estacionario y el aclaramiento), no se alteraban durante la neutropenia y permanecían iguales a los de la primera dosis [193]. Este dato es muy importante ya que, por el contrario, se observó que la absorción oral del ciprofloxacino disminuía en pacientes sometidos a quimioterapia [194].

Una de las principales preocupaciones del uso de las quinolonas en la profilaxis del paciente neutropénico fue la emergencia de microorganismos resistentes. El uso sistemático de profilaxis con ciprofloxacino en los pacientes oncohematológicos, se asoció rápidamente con la aparición de *Escherichia coli* resistente a quinolonas. También se observó que la administración profiláctica de levofloxacino podía influir en la selección de estreptococos del grupo viridans resistentes a quinolonas [193]). La selección de otros patógenos resistentes como *Enterococcus faecium* no se ha estudiado en profundidad hasta la fecha, pese a haberse notificado un aumento en las infecciones enterocócicas en este grupo de pacientes [195–197]

Numerosos estudios han mostrado que los clones de *E. faecium* resistentes a la vancomicina y/o ampicilina, también lo eran a quinolonas, lo que indica la importancia de conocer el papel de la profilaxis por levofloxacino para la selección de estos clones multiresistentes en el ambiente hospitalario [127,198].

En el Hospital Universitario Ramón y Cajal, se ha puesto de manifiesto un gran aumento de bacteriemias producidas por *E. faecium*, incrementándose la resistencia a ampicilina de estos aislados desde un 42% en 1995 a más del 90% en 2015. Además, este aumento se ha asociado a la diseminación de una subpoblación de *E. faecium* asociada al hospital (BAPS 2.1a y BAPS 3.3a) [199].

Debido a la importancia de *E. faecium* resistente a ampicilina como agente productor de bacteriemias en el paciente oncohematológico con neutropenia y ante la escasez de trabajos prospectivos centrados en este aspecto, se hacen necesarios estudios prospectivos que analicen su relación directa con la infección y su persistencia en el TGI.





## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La colonización de los pacientes oncohematológicos que reciben profilaxis extendida con levofloxacino por *E. faecium* resistente a ampicilina puede ser un factor de riesgo importante en el desarrollo de bacteriemia por este microorganismo. El conocer como se desarrolla este proceso de colonización, así como las principales características de los clones implicados puede ser fundamental a la hora de prevenir y tratar las infecciones que puedan originar en este tipo de pacientes.

Los objetivos que se plantearon en este capítulo fueron los siguientes:

1. Analizar la **dinámica de la colonización intestinal** (adquisición y persistencia) de *E. faecium* resistente a ampicilina (EfmRA) en pacientes oncohematológicos que recibieron profilaxis extendida con levofloxacino durante su estancia hospitalaria.
2. Identificar los **factores clínico-epidemiológicos** asociados a la colonización por EfmRA e investigar la prevalencia de infecciones por estos microorganismos en los pacientes oncohematológicos
3. Describir la **estructura poblacional** de los aislados de EfmRA con distintas herramientas de tipificación molecular y evaluar la utilidad de una técnica basada en características fenotípicas (Phene Plate™) para el tipado de aislados de origen clínico.
4. Describir las **características microbiológicas** (perfil de sensibilidad antibiótica, genes asociados a virulencia y presencia de bacteriocinas) de los aislados de colonización y de infecciones invasivas de EfmRA de estos pacientes.
5. Caracterizar los **mecanismos moleculares** implicados en el desarrollo de **resistencia a linezolid** en dos aislados de EfmRA de colonización y descripción del contexto clínico-epidemiológico en el que esta resistencia emerge.
6. Evaluar **los cambios** que se producen en **la microbiota intestinal** de un subgrupo de pacientes oncohematológicos durante el ingreso.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Diseño del estudio

Este es un estudio de carácter prospectivo y observacional que se desarrolló durante un periodo de tres años (julio de 2009-2012) en el Servicio de Microbiología y en la Unidad de Oncohematología del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Durante este periodo se ofreció la participación voluntaria en el estudio a todos los pacientes mayores de 18 años con un diagnóstico de leucemia aguda o crónica, linfoma Hodgkin/no Hodgkin, mieloma múltiple o mielofibrosis que ingresaron en el Servicio de Hematología. En función de la enfermedad hematológica de base y de su estado clínico, los pacientes recibieron distintos regímenes de quimioterapia intensiva (fase de inducción, reinducción, consolidación o trasplante de precursores hematopoyéticos) de acuerdo a las recomendaciones de las guías locales. Como consecuencia de la quimioterapia, y en algunos casos de la propia enfermedad, desarrollaron una neutropenia ( $<500$  neutrófilos/ $\mu\text{l}$ ) pos-quimioterápica de larga duración ( $>7$  días).

Todos los pacientes recibieron profilaxis extendida con levofloxacin (PEL) (500 mg/24h) desde el ingreso y de manera concomitante con la quimioterapia. En aquellos pacientes que se sometieron un trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH), la PEL se combinó con trimetoprim-sulfametoxazol (profilaxis con cotrimoxazol, 160/800 mg/24h) como parte del acondicionamiento pre-trasplante. La PEL se mantuvo durante toda la duración de la quimioterapia, en los pacientes que permanecieron afebriles, y se suspendió una vez recuperados de la neutropenia ( $>500$  neutrófilos/ $\mu\text{l}$ ). Si, por el contrario, el paciente desarrollaba fiebre durante la quimioterapia, la PEL se suspendía y se administraba de manera empírica uno o varios antibióticos de amplio espectro o dirigida cuando se aisló el agente causal de la infección.

Para facilitar el análisis de resultados y estudiar la evolución de la colonización durante el ingreso, se dividió el periodo de estudio para cada paciente en tres sub-periodos:

- 1) **Basal:** periodo de tiempo comprendido entre el ingreso y el inicio de la administración de la PEL (en las primeras 48h tras el ingreso). En los pacientes que recibieron un segundo ciclo de quimioterapia durante el mismo ingreso, se consideró como segundo periodo basal al tiempo comprendido entre la recuperación de la neutropenia del episodio anterior y la nueva administración de PEL y quimioterapia.
- 2) **PEL:** periodo del ingreso durante el que se administra al paciente levofloxacin en profilaxis extendida y la correspondiente terapia antitumoral.
- 3) **pos-PEL:** periodo del ingreso comprendido entre la suspensión de la PEL y el alta hospitalaria o la administración de un nuevo ciclo de quimioterapia.

Los pacientes permanecieron ingresados en habitaciones individuales con acceso restringido en el Servicio de Hematología, bien en la Unidad de Trasplante de Médula Ósea (UTMO), o en el área de Hospitalización General, que cuentan con 8 y 11 habitaciones individuales respectivamente. Durante su estancia hospitalaria, los pacientes pudieron recibir más de un ciclo de quimioterapia intensiva, desarrollando consecuentemente, uno o más episodios de neutropenia.

Los datos clínico-demográficos con relevancia para el estudio, como: edad, sexo, tipo de enfermedad, estadio de enfermedad, tipo de terapia antitumoral, número de episodios de neutropenia, duración de la neutropenia, duración del ingreso, duración de la PEL, ingresos previos, desarrollo de mucositis y grado de la misma, episodios de bacteriemia y terapia antibacteriana de amplio espectro, se obtuvieron de las historias clínicas.

Este proyecto de investigación, financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (PS09-00825), fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital (número de referencia CEIC-106/09). Cumpliendo con los requisitos establecidos en el Informe Belmont, todos los pacientes fueron debidamente informados sobre los objetivos y metodología del estudio, y firmaron el correspondiente formulario de Consentimiento Informado.

## 2. Definiciones

En el análisis de resultados se emplearon las siguientes definiciones:

- a) **Episodio de neutropenia (EN)**: periodo del ingreso que abarca desde el inicio de la quimioterapia y de la PEL hasta la recuperación de la neutropenia. Este término no hace referencia exclusivamente al periodo en el que el paciente permanece con recuento de neutrófilos inferior a 500/ $\mu$ l, sino que se emplea como unidad de estudio.
- b) **Primer episodio de neutropenia**: primer episodio tras la inclusión del paciente en el estudio, indistintamente de la fase de la enfermedad en que el paciente se encuentre o de si ha recibido previamente algún ciclo de quimioterapia en este u otro centro.
- c) **Colonización**: detección de EfmRA en al menos una muestra de heces durante el periodo de hospitalización o durante el episodio de neutropenia (en función de si la unidad de estudio son pacientes o episodios de neutropenia).
- d) **Adquisición de colonización**: primera detección de EfmRA en un sub-periodo del estudio cuando los cultivos previos hasta ese momento han sido negativos.
- e) **Colonización persistente**: detección de EfmRA en al menos dos muestras fecales durante el periodo de seguimiento de los pacientes.
- f) **Episodio de bacteriemia**: detección de EfmRA en uno o varios hemocultivos del paciente durante un episodio de neutropenia. Todos aquellos hemocultivos positivos con el mismo microorganismo y entre medio de los cuales no se obtuvo ningún cultivo negativo, fueron considerados el mismo episodio de bacteriemia.

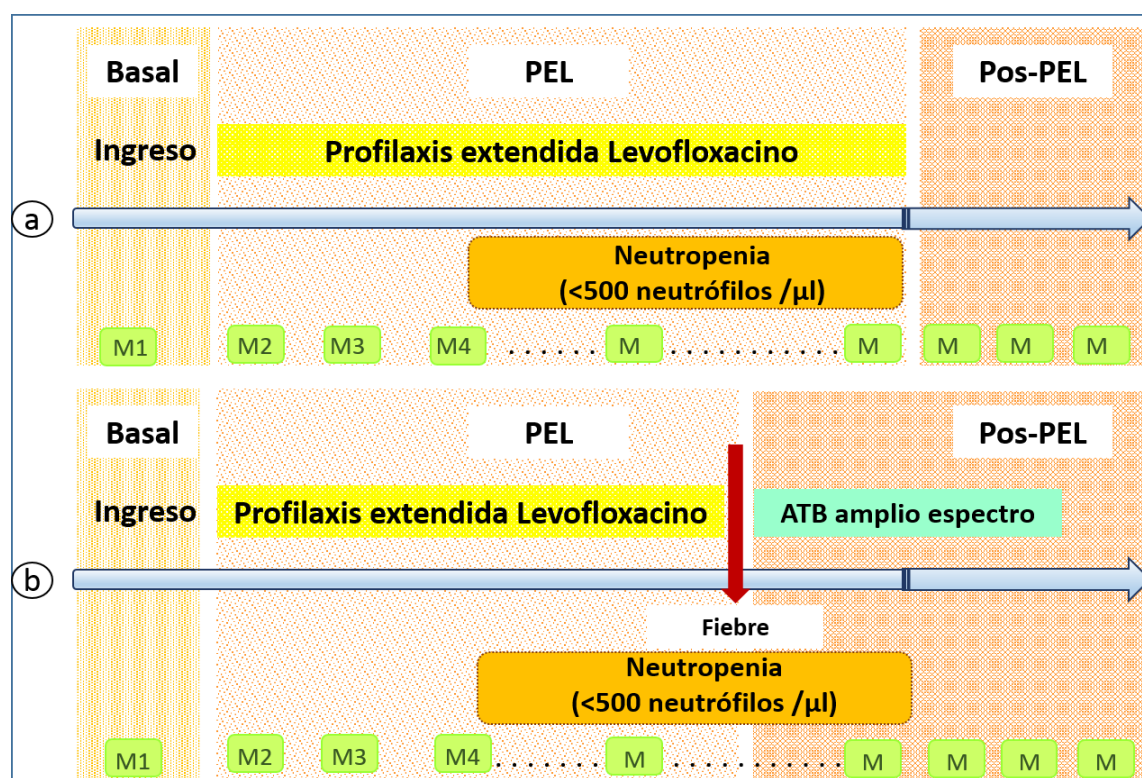
## 3. Recogida y procesamiento de muestras

### 3.1. Muestras fecales

De cada episodio de neutropenia de los pacientes incluidos en el estudio se recogieron muestras de heces de acuerdo al siguiente esquema (figura 7):

1. **Basal.** En las primeras 48h tras el ingreso/previo a administración de nuevo ciclo de quimioterapia- 1 muestra.
2. **Durante la PEL.** Al inicio y durante el tiempo que dure la profilaxis- 2 muestras/semana.
3. Tras la interrupción de la PEL (**neutropenia febril**)- al menos 2 muestras/semana, hasta el alta.

La muestra del ingreso es representativa del estado basal de colonización del paciente (Basal), las muestras recogidas durante la administración de PEL, representan la colonización durante este periodo y aquellas recogidas durante la neutropenia febril y la recuperación de la neutropenia serían representativas de la colonización durante el período pos-LEP.



**Figura 7.** Periodos del estudio y esquema de recogida de muestras de heces de los pacientes reclutados para el estudio. a) Esquema más frecuente en el que la recuperación de la neutropenia coincide con la suspensión de la profilaxis con levofloxacino, b) toma de muestras y periodos cuando la profilaxis debe interrumpirse por la aparición de fiebre.

Para el cribado de EfmRA, se suspendieron 0,5 g de heces en 1 ml de solución salina estéril (0,9% de NaCl) y se sembró una alícuota de 100 μl en placas con medio m-*Enterococcus* (Difco, Becton Dickinson, NJ, EE.UU.) suplementado con 10 mg/L de ampicilina (m-Ent-Amp). Las placas se incubaron a 36±1°C durante 24-48 h. En aquellas placas en las que se observó crecimiento, una única colonia de cada morfotipo se sub-cultivó en agar sangre (bioMérieux, Francia) y en medio m-Ent-Amp.

### 3.2. Muestras clínicas

Se realizó un seguimiento de todas las muestras clínicas (hemocultivos, catéteres, urocultivos y muestras respiratorias) de los pacientes incluidos en el estudio que fueron remitidas al Servicio de Microbiología. Todas las muestras clínicas en las que se aisló EfmRA se incluyeron junto con el resto de aislados de colonización para su posterior caracterización molecular.

## 4. Identificación bacteriana

La identificación de los aislados de muestras de heces y la confirmación de aquellos procedentes de muestras clínicas se realizó mediante:

- a) El **sistema semiautomático WIDER** (Fco. Soria Melguizo, Madrid) que emplea paneles multipocillo con sustratos deshidratados, que tras su reconstitución con una suspensión bacteriana e incubación 18 h a 37°C, permite la identificación a nivel de especie en función de la hidrólisis o utilización de dichos sustratos.
- b) Detección y análisis de las proteínas ribosomales del 16S rARN mediante **espectrometría de masas** (Maldi-Tof, Bruker Daltonics, Alemania). Para ello se deposita una fracción de una colonia bacteriana (cultivo puro) sobre una tarjeta metálica junto con una matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico) que co-cristalizará junto con la muestra. Tras la irradiación con láser de la muestra en condiciones de alto vacío, se producirá la desorción de los iones moleculares generados que serán acelerados en función de su masa-carga en un campo electromagnético. Los iones más ligeros (menor relación masa/carga), se acelerarán más rápido, tendrán un menor tiempo de vuelo y accederán antes al detector. En función de la abundancia relativa de estos iones en la bacteria se generarán picos más o menos altos, cada uno de los cuales representa una molécula. Como resultado de la incisión de todos los iones generados sobre el detector, se generará un espectro (2.000-20.000 Da) que se comparará con aquellos almacenados en la base de datos. La especie o el género con el espectro más similar al generado, se mostrará en la pantalla junto con un score logarítmico, indicativo del grado de identidad.

## 5. Análisis de la estructura poblacional

La estructura poblacional de los aislados de EfmRA se estableció mediante tres herramientas moleculares distintas:

### 5.1. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

La electroforesis en campo pulsado se basa en la restricción con exonucleasas del ADN cromosómico bacteriano, que se encuentra inmovilizado en moldes de agarosa, y la posterior separación de estos fragmentos mediante la aplicación de pulsos de corriente con distinta orientación. Estos pulsos eléctricos permiten la reorientación y migración de los fragmentos de ADN en el gel, en función de su peso molecular. Esta técnica, a diferencia de la electroforesis en corriente continua, permite la resolución de fragmentos de ADN de alto peso molecular (40 Kb y 10 Mb).

Todos los aislados de EfmRA obtenidos a partir de muestras fecales y clínicas se caracterizaron mediante electroforesis en campo pulsado. Para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos:



- a) Extracción del ADN *in situ* en bloques de agarosa. Se inoculó una colonia de EfmRA en 1 ml de BHI y se incubó 24 h a 37°C. De este cultivo se tomaron 200 µl y se centrifugaron 5 min a 8.000 r.p.m. Tras eliminar el sobrenadante, el *pellet* se suspendió con 300 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH=7,6; EDTA 1mM pH=8) y se centrifugó de nuevo a 8.000 r.p.m. 5 min. Este paso de lavado con TE se repitió una vez más. A continuación, se decantó el sobrenadante y el *pellet* se suspendió primero con 300 µl de TE, y se mezcló, posteriormente, con 300 µl de una solución de agarosa al 2% disuelta en TBE 0,5x (45 mM Tris-base, 45 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA). La mezcla resultante se depositó en moldes adecuados y se dejó enfriar durante al menos 10 min a 4°C. Los bloques de agarosa obtenidos se incubaron con 2 ml de solución de lisis EC (Tris-HCl 6 mM; NaCl 1 M; Brij-58 0,5%; Deoxicolato 2%; Sarkosil 0,5%; RNAsa; lisozima 1 mg/ml) en un baño a 37°C con agitación *overnight* (*o.n.*). Transcurrido este tiempo se eliminó la solución EC y se sustituyó por 1 ml de solución de EPS (EDTA 0,5 M; proteinasa K 50 µg/ml; Sarkosil 1%) incubando el conjunto a 56°C *o.n.* con agitación. Se realizaron 4 lavados con 1 ml de TE tras eliminar la solución EPS (2 lavados a 56°C durante 10 min y otros 2 a temperatura ambiente también durante 10 min).
- b) Digestión del ADN con la enzima de restricción. Se escindió aproximadamente un tercio de cada bloque de agarosa y se incubó con la solución de digestión (30 U/µl *Sma*I, Tampón 10 x y BSA 0,1%) (New England BioLabs Inc, EE. UU.) durante 18 h a 30°C.
- c) Electroforesis en campo pulsado. Los bloques de agarosa con el ADN, se embebieron en un gel de agarosa al 1,2% (D5 Pronadisa) en TBE 0,5x. Esta agarosa, debido a su baja electroendósmosis (<0,12) permite una óptima movilidad electroforética y separación de los fragmentos de ADN. La separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en el sistema CHEF-DRIII (BioRad, Francia) a 6V/cm<sup>2</sup> con pulsos de 0,5-40 seg durante 23 h. En cada gel se incluyeron dos carriles con marcadores de peso molecular que incluyeron 50 bandas diferentes en un rango desde 48,5 Kb hasta 1.018,5 Kb (Lambda Ladder PFGE Marker, New England BioLabs Inc).
- d) Visualización de los fragmentos de ADN separados. Para la visualización de las bandas se sumergieron los geles en una solución de Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml) o GelRed 3x (Biotium, California, EE. UU.) y posteriormente se eliminó el exceso de agente intercalante en una solución acuosa. Los geles se iluminaron con luz UV en un transiluminador (Chemidoc MP Imaging System, BioRad). Para su posterior interpretación, los geles se fotografiaron mediante el equipo Gel Logic 100 imaging System (Carestream Health Inc, Rochester, NY, EE. UU.).

La **interpretación** de los perfiles electroforéticos resultantes se realizó:

- a) visualmente aplicando los criterios establecidos por Tenover y cols. (1995) [200] que proponen como aislados 1) **idénticos**, a aquellos que presentan el mismo número de bandas; 2) **altamente relacionados**, cuando difieren un máximo de tres bandas, 3) **posiblemente relacionados**, cuando presentan 4-6 bandas diferentes como máximo y 4) **no relacionados**, cuando el patrón de bandas difiere en  $\geq 7$  bandas de diferencia.
- b) mediante el programa informático BioNumerics v6.1 (Applied Maths NV, Disponible en: <http://www.applied-maths.com>). Este sistema calcula matrices de similitud que se agrupan mediante el método UPGMA, permitiendo la generación de un dendrograma. La similitud entre los diferentes patrones de bandas se analizó mediante el coeficiente de Dice. Para la



construcción del dendrograma se aplicó una optimización del 0,5% y una tolerancia del 1%. Se consideraron aislados pertenecientes al mismo clon o tipo de PFGE aquellos que presentaron en el dendrograma una similitud >85% ( $\leq 3$  bandas de diferencia).

La diversidad de la población se determinó de manera global y para cada uno de los subperiodos mediante el cálculo del índice de diversidad de Simpson ( $D_i$ ):  $D_i = 1 - [(1/N(N - 1)) \sum n_i (n_i - 1)]$ , donde  $n$  fue el número de aislados pertenecientes al subtipo  $i$  y  $N$ , el número total de aislados. Este índice es una medida de la probabilidad de que dos aislados no relacionados de la población de estudio se clasifiquen en grupos diferentes por la técnica de tipificación elegida. Valores elevados de  $D_i$  son indicativos de una población con alta diversidad clonal, mientras que valores bajos (valor mínimo, 0) indican el predominio de uno o varios tipos dentro de la población.

## 5.2. Multi Locus Sequence typing (MLST)

Esta técnica se basa en la amplificación y secuenciación de fragmentos internos de siete genes, con funciones relacionadas con el mantenimiento celular (*housekeeping*), y su comparación con aquellos existentes en una base de datos (<http://efaecium.mlst.net/>). A cada uno de los alelos de la cepa estudiada se le asigna un número y de la combinación resultante de los siete genes se obtiene un número denominado secuencia tipo (ST).

De cada uno de los diferentes perfiles obtenidos por PFGE (aislados no considerados idénticos ni altamente relacionados) se seleccionó una única cepa como representante para llevar a cabo la caracterización por MLST. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

### 5.2.1. Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico de las cepas de EfmRA se utilizaron dos métodos alternativos:

- **método del hervido (*boiling*).** Se basa en la lisis bacteriana por calor seguido de la precipitación de los detritos celulares. Para ello se realizó una suspensión bacteriana a partir de un cultivo *o.n.* (medio agar sangre) de la cepa a caracterizar en 300  $\mu$ l de TE. Éste se mantuvo a 100°C en un baño durante 10 min y a continuación se centrifugó durante 5 min a 10.000 r.p.m. El ADN contenido en el sobrenadante se conservó a 4°C durante una semana.
- **método comercial** (Wizard Genomic DNA purification kit, Promega). Se obtuvo el ADN a partir de un cultivo *o.n.* en 1 mL de caldo infusión cerebro-corazón (BHI, Becton Dickinson) de las cepas seleccionadas. La extracción se realizó siguiendo las indicaciones del protocolo comercial mediante tratamiento en distintas etapas con 10 mg/ml de lisozima, solución de lisis y RNasa. Tras precipitar las proteínas mediante la solución comercial, el ADN se precipitó con isopropanol, seguido de centrifugación y lavado con etanol al 70%. El pellet obtenido, tras centrifugar y dejar secar al aire, se reconstituyó con solución de hidratación y se mantuvo a 4°C hasta su utilización.

### 5.2.2. Amplificación de genes *housekeeping* por PCR

Se amplificaron fragmentos internos de los siguientes genes *housekeeping*: *adk* (adenilato kinasa), *atpA* (subunidad alfa, ATP sintasa), *ddl* (D-alanina: D-alanina ligasa), *gdh* (glucosa- 6- fosfato deshidrogenasa), *gyd* (gliceraldehído-3-fosfatoP-DHG), *purK* (subunidad de la ATPasa, foforribosil aminoimidazol carboxilasa) y *pstS* (transportador de unión a la ATP-fosfatasa) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) siguiendo el esquema desarrollado por Homan y cols. [201].

Todas las reacciones se llevaron a cabo en termocicladores MJ Research PTC-100 (Global Medical Instrumentation Inc, EE. UU.) en un volumen final de 25 µl que contenía las siguientes concentraciones finales de reactivos (GoTaq Promega, Wisconsin, EE. UU.): tampón de reacción (1x), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), mezcla de dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), cebadores directo y reverso (1 pmol/µl cada uno), Gotaq® polimerasa (1,5 U) y agua libre de nucleasas. Para ello se emplearon las condiciones siguientes: 1 ciclo de activación a 94°C ,10 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C, 30 seg; hibridación durante 30 seg (temperaturas de *melting* (T<sub>m</sub>) en tabla 4); elongación a 72°C, 30 seg y, por último, 1 ciclo a 72°C, 5 min.

**Tabla 4.** Cebadores específicos y temperaturas de melting (T<sub>m</sub>) empleadas en la amplificación de genes de MLST.

Gen	Tamaño (pb)	Cebadores	Secuencia (5'-3')	T <sub>m</sub>
<i>adk</i>	437	adk1	TATGAACCTCATTTTAATGGG	52
		adk2	GTTGACTGCCAAACGATTTT	
		adk1n	GAACCTCATTTTAATGGGG	54
		adk2n	TGATGTTGATAGCCAGACG	
<i>atpA</i>	556	atpA1	CGGTCATACGGAATGGCACA	56
		atpA2	AAGTTCACGATAAGCCACGG	
		atpA1n	TTCAAATGGCTCATACGG	50
		atpA2n	AGTTCACGATAAGCAACAGC	
<i>ddl</i>	465	ddl1	GAGACATTGAATATGCCTTATG	50
		ddl2	AAAAAGAAATCGCACCG	
<i>gdh</i>	530	gdh1	GGCGCACTAAAAGATATGGT	54
		gdh2	CAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<i>gyd</i>	395	gyd1	CAAAGTCTTAGCTCCAATGGC	54
		gyd2	CATTTCGTTGTCATACCAAGC	
<i>purK</i>	492	purK1	GCAGATTGGCACATTGAAAGT	56
		purK2	TACATAAATCCCGCCTGTTTC	
		purK1n	CAGATTGGCACATTGAAAG	52
		purK2n	TTCATTACATATAGCCCG	
<i>pstS</i>	583	pstS1	TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG	52
		pstS2	CGTGATCACGTTCTACTTCC	
		pstS1n	TTGAGCCAAGTCGAAGC	

### 5.2.3. Separación y visualización de los productos de amplificación

Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa mediante electroforesis en corriente continua de la siguiente manera:

- a) preparación del gel: se disolvieron 2 g de agarosa D-1 Low EEO (Pronadisa) en 100 ml de TBE 0,5 x y se vertió en los moldes adecuados para electroforesis. Esta concentración de agarosa al 2% permite la separación óptima de fragmentos de ADN de < 1 Kb.
- b) electroforesis: se depositaron 5 µl de cada producto de PCR en los pocillos del gel (la enzima GoTaq tiene incorporado en su tampón el tampón de carga). La separación de los fragmentos se llevó a cabo en una cubeta horizontal con tampón TBE 0,5 x a 80-100V durante 30-40 min. En cada gel se cargó además el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs Inc).
- c) visualización de los productos: Los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) o GelRed 3x (Biotium, California, EE. UU.) y, tras eliminar el exceso de agente intercalante en una solución acuosa, se iluminaron con luz UV en un transiluminador (Chemidoc MP Imaging System, BioRad). Para su interpretación, los geles se fotografiaron mediante el equipo Gel Logic 100 imaging System (Carestream Health Inc, Rochester, NY, EE. UU.).

### 5.2.4. Purificación y secuenciación del ADN

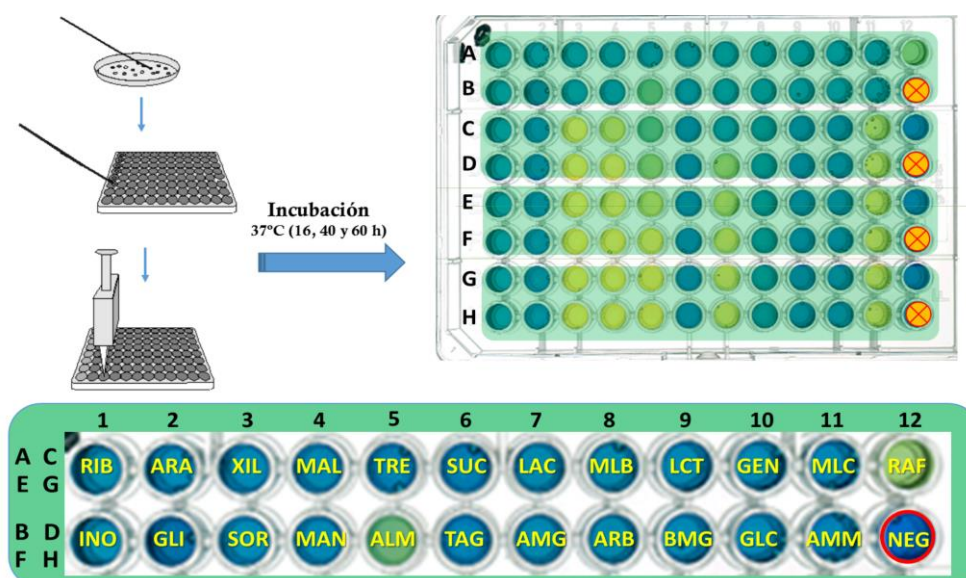
Los productos de PCR se purificaron mediante purificación enzimática con el ExoSAP-IT® purification kit (USB Corp, Cleveland, EE. UU.) o mediante columnas de intercambio iónico, QIAquick PCR purification kit (Quiagen GmbH) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados se secuenciaron empleando el secuenciador automático ABI Prism 377 (PE, Norwalk, EE. UU.).

Las secuencias obtenidas se visualizaron y analizaron mediante el programa Chromas Lite (Technelysium, Australia) y se alinearon con una secuencia de referencia de *Enterococcus faecium*, mediante el programa Clustal W (EMBL-EBI, Reino Unido, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Las secuencias de cada uno de los genes *housekeeping* de cada cepa se introdujeron en la base de datos del MLST (<http://efaecium.mlst.net/>) y se compararon con los alelos ya descritos. La combinación de cada uno de estos 7 alelos generó un “perfil alélico” al que se le asignó una secuencia tipo (sequence type, ST). Además, cada clon se clasificó en un grupo de BAPS, en función de su ST y de acuerdo a la clasificación propuesta por Tedim y cols.[166].

### 5.3. Sistema Phene Plate™ (PhP System)

El sistema PhP es una técnica para la tipificación rápida de bacterias que se lleva a cabo en placas de 96 pocillos que contienen 4 conjuntos de sustratos deshidratados, específicamente seleccionados para la caracterización de enterococos (figura 8). La tipificación se basa en la determinación de la cinética de 23 reacciones bioquímicas con alto poder discriminativo (metabolización de azúcares) en tres intervalos definidos durante la incubación de las microplacas.



**Figura 8.** Distribución de los sustratos en las Enterococci Phene plates. Cada placa permite el tipado de 3-4 aislados distintos. Abreviaturas: RIB, ribosa; ARA, arabinosa; XIL, xilosa; MAL, maltosa; TRE, trehalosa; SUC, sacarosa; LAC, lactosa; MLB, melibiososa; LCT, lactulosa; GEN, gentibiososa; MLC, melecitososa; RAF, rafinosa; INO, inositol; GLI, glicerol; SOR, sorbitol; MAN, manitol; ALM, almidón; TAG, tagatosa; AMG, amigdalina; ARB, arbutina; BMG, beta-metil glucósido; GLC, gluconato; AMM, alfa-metil manósido; NEG, negativo.

La técnica se realizó de la siguiente manera:

- 1) Se inocularon todos los pocillos con **150 µl de medio de cultivo** estéril (proteosa peptona 2 g/L; extracto de levadura 0,5 g/L; NaCl 5 g/L; tampón fosfato 0,3 M pH=7,5) al que se le añadió azul de bromotimol 0,01% (m/m) pH=7,8 como indicador. Las placas se mantuvieron 1 h a temperatura ambiente para permitir la correcta rehidratación de los sustratos
- 2) A continuación, se añadieron **150 µl adicionales de medio** con indicador al último pocillo de las filas pares (2-12, 4-12, 6-12, 8-12). Cada uno de estos pocillos se inoculó con una colonia del aislado de enterococos a tipar, procedente de un cultivo *o.n.* en medio sólido agar sangre. Las dos últimas filas de cada placa se dejaron sin inocular y se emplearon como control negativo.
- 3) Se homogeneizaron las suspensiones bacterianas y se inocularon cada uno de los 23 pocillos restantes con 10 µl de ellas. Se cubrieron las placas con tapas de plástico estériles y se incubaron a 37°C en una cámara húmeda.
- 4) La **tasa de metabolización de los sustratos** se midió mediante un escáner (HP Scanjet 4890 Photo Scanner, 75 dpi y 256 colores) transcurridas **16, 40 y 60** horas de incubación a 37°C. Los resultados, expresados inicialmente como colores, se transfirieron y se convirtieron en valores de absorbancia mediante el software PhPWin (PhPlate Microplate Techniques AB). Tras la última medida, se calcularon los valores de metabolización medios para cada reacción.

La tasa de metabolización de cada sustrato adquirió un valor comprendido entre 0 y 22. Los valores bajos, 0-5, fueron indicativos de reacciones ácidas (amarillo) mientras que los valores altos, 12-22, representaron reacciones de metabolización lentas o ausencia de utilización del sustrato (azul intenso). La **huella bioquímica** de cada aislado se compuso de una serie de **24 cifras** con valores comprendidos entre 0-22.

Todos los valores se compararon dos a dos y la similitud de cada pareja se expresó mediante el **coeficiente de correlación** (un valor próximo a 1 indicaba que los dos aislados comparados tenían huellas bioquímicas similares). Esto generó matrices de similitud que consistieron en  $n(n - 1)/2$  coeficientes de correlación, donde  $n$  fue el número de aislados. La matriz de similitud se agrupó mediante el método UPGMA para generar un dendrograma. La diversidad de los aislados se determinó empleando tres niveles de similitud distintos: 0,975; 0,95 y 0,90. Los aislados que presentaron un coeficiente de correlación mayor o igual al nivel de identidad predefinido (nivel de similitud) se asignaron al mismo grupo de PhP.

La reproducibilidad de la técnica se verificó mediante el estudio por duplicado y en dos ensayos independientes (intra e inter-ensayo) de 10 aislados aleatorios del estudio, 3 aislados clínicos de *E. faecium* resistente a ampicilina pertenecientes al clon sueco FMSE1, altamente diseminado en hospitales de ese país [119] y la cepa de referencia *E. faecium* ATCC 51559.

### 5.3.1. Análisis de clasificación cruzado

Los resultados obtenidos mediante esta técnica de tipado se compararon con los resultados obtenidos mediante PFGE. Todas las posibles parejas de aislados ( $n(n-1)/2$ ) se clasificaron de manera cruzada en grupos coincidentes (acuerdos) o no coincidentes (desacuerdos) por cada una de las dos técnicas y para cada nivel de similitud, construyéndose con ellos tablas de dos por dos. El índice de diversidad de Simpson (apartado 5.1) se calculó para determinar el poder discriminatorio de cada una de las técnicas de tipado y de los niveles de similitud seleccionados.

La concordancia entre ambos métodos se determinó mediante el cálculo del **índice kappa de Cohen ( $\kappa$ )**:  $\kappa = P(a) - \frac{P(e)}{1} - P(e)$ . Donde  $P(a)$  es el acuerdo relativo o proporción de concordancia observada y  $P(e)$  la proporción de concordancia esperada por azar.

Este índice es una medida estadística que ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada cuando la variable que se mide es categórica y se expresa de forma binaria [202]. En función del valor del índice kappa la fuerza de la concordancia se calificó como: **pobre o débil** (valores < 0,4), **moderada** (0,41-0,6), **buena** (0,61-0,8) o **muy buena** (valores >0,8) [203].

### 5.3.2. Perfiles de utilización de azúcares

En base a los valores de la tasa de metabolización de los sustratos incluidos en el esquema de tipado PhP se definieron tres categorías de utilización de azúcares:

- a) **0-8**: azúcares de alta metabolización
- b) **9-16**: azúcares de metabolización variable o media
- c) **17-22**: azúcar de baja o nula metabolización



Esta clasificación permitió examinar cuales de estos azúcares se metabolizaban con independencia del clon al que pertenecieran los aislados y describir, los perfiles de utilización más frecuentes o asociados a un determinado clon.

## 6. Estudio de sensibilidad antibiótica

### 6.1. Difusión con disco y microdilución

Para verificar la resistencia a la ampicilina de los aislados obtenidos del medio m-Ent-Amp, se empleó la técnica de **difusión con disco** siguiendo las recomendaciones de EUCAST ([www.eucast.com](http://www.eucast.com)). Se emplearon discos de 10 µg de ampicilina (Oxoid LTD, Inglaterra) y agar Müller-Hinton (Oxoid). Los resultados se interpretaron según los criterios establecidos por EUCAST ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)). Eucast clinical breakpoints table v7.0 2017-01-01): sensible  $\geq 10$  mm, resistente  $< 8$  mm.

El perfil de sensibilidad antibiótica de los aislados de EfmRA se estudió por **microdilución** mediante el sistema semi-automático **Wider** (Francisco. Soria Melguizo, Madrid) y los paneles MIC/ID Gram Pos-2. Estos paneles contienen antibióticos liofilizados que, tras su suspensión con el inóculo bacteriano, originan concentraciones de antibiótico en base dos y permiten la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se empleó para ello el inóculo recomendado por EUCAST (0,5 McFarland= $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) y la lectura se realizó tras 18-20 h de incubación a 37°C.

De cada paciente, se seleccionó por cada clon identificado por electroforesis de campo pulsado, el primer y último aislado de EfmRA correspondiente a cada episodio de neutropenia desarrollado durante el ingreso. En aquellos pacientes con un único episodio de neutropenia y un ingreso de larga duración ( $> 15$  días) se incluyeron a demás 1 o más aislados intermedios. La categorización clínica de los aislados se realizó empleando los puntos de corte propuestos por EUCAST. Para la eritromicina y el levofloxacino, al no existir en la actualidad puntos de cortes clínicos, se utilizaron los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) definidos por este mismo comité.

### 6.2 Caracterización de la resistencia a linezolid

La resistencia a linezolid se caracterizó mediante procedimientos fenotípicos, microdilución y tiras de difusión en gradiente, y genotípicos, amplificación/secuenciación de los genes 23S rADN y *cfp*. Mutaciones puntuales en el primero y la adquisición del segundo, son los principales mecanismos que se han asociado a la expresión de resistencia a linezolid.

#### 6.2.1. Descripción del caso clínico

Se recogió información relevante del paciente y del contexto clínico en el que se aislaron las cepas resistentes a linezolid.

### 6.2.2. Microdilución y difusión en gradiente

La resistencia a linezolid (CMI>4mg/L) fue inicialmente detectada mediante microdilución (sistema Wider, ver apartado 6.1) y confirmada mediante tiras de difusión en gradiente (Etest®, BioMérieux Vitek, Francia) en placas de agar Müller-Hinton siguiendo las recomendaciones de EUCAST. Las CMIs se definieron como aquellas concentraciones que produjeron la inhibición del 90% del crecimiento bacteriano.

### 6.2.3. Amplificación/secuenciación de los genes 23S rADN y *cfr*

Para la caracterización molecular de la resistencia a linezolid se amplificó mediante PCR, y se secuenció posteriormente una región interna del **dominio V** de los genes que codifican para el **23S rADN**.

Adicionalmente se investigó, mediante PCR, la presencia del **gen *cfr***.

La extracción de ADN, amplificación, separación y visualización de los productos se realizó siguiendo lo descrito en el apartado 5.2.1., 5.2.2. y 5.2.3. Los cebadores y Tm empleadas en la amplificación de estos genes se detallan en la tabla 5 [98,104,204,205]. Cuando se obtuvo amplificación de alguno de estos genes, se purificó y secuenció el producto de PCR siguiendo los pasos detallados en el apartado 5.2.4. La presencia de una mutación puntual G2576T o de un polimorfismo en dicha posición detectado en el cromatograma, condujo al estudio por pirosecuenciación de esas cepas.

**Tabla 5.** Cebadores específicos Tm empleadas en la amplificación de los genes estudiados para la caracterización molecular de la resistencia a linezolid.

Gen	Tamaño (pb)	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Referencias
PCR convencional					
23S rADN	389	23S-F	GCAGAAGGGAGCTTGACTGCGAG	60	Marshall y cols., 2002
		23S-R	CCCAGCAATGCCCTTGGCAG		
cfr	746	cfr-F	TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA	57	Kehremberg y cols., 2005
		cfr-R	ACCATATAATTGACCACAAGCAGC		
pirosecuenciación					
23S rADN	96	q23S-F	Bi-GCA TCC TGG GGC TGT AGT C	60	Woodford y cols., 2002
		q23S-R	GGA CCG AAC TGT CTC ACG AC		
23S rADN	9	piro-F	CGT TCT GAA CCC AGC	--	Sinclair y cols., 2003

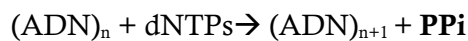
### 6.2.4. Pirosecuenciación

La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación que emplea 4 enzimas distintas (ADN polimerasa, sulfúrilasa, luciferasa y apirasa) y permite la detección en tiempo real de la síntesis de ADN mediante un proceso de bioluminiscencia. El proceso aparece esquematizado en la figura 9.

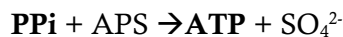
Para verificar la presencia del polimorfismo único en el nucleótido (SNP) en la posición 2576 del gen 23S rADN (numeración de *E. coli*) y para estimar el número de alelos mutados, se llevó a cabo la pirosecuenciación de un fragmento de 9 nt de este gen. Las distintas etapas del proceso fueron las siguientes [206]:

1. **Amplificación** (PCR) de un fragmento interno de 92 pb de los genes 23S rADN empleando las condiciones y cebadores (el directo estaba biotinilado en 5') descritos en la tabla 5. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 µl utilizando los reactivos a las concentraciones finales detalladas en el apartado 5.2.2. y la polimerasa Ultratools (1 U/µl, Biotools, Madrid, España). El ADN se purificó mediante el kit comercial QIAquick PCR purification kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania).
2. **Captura** de las **cadenas sencillas biotiniladas** empleando perlas recubiertas de **sefaroza-estreptavidina** (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) en una Vacuum Prep Workstation. En la superficie de cada perla quedaron adheridas numerosas cadenas sencillas de ADN que se emplearon como molde para la pirosecuenciación.
3. La **pirosecuenciación** tuvo lugar en un analizador PyroMark Q96 ID utilizando el kit comercial PyroMark Gold SQA (Qiagen, GmbH) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los nucleótidos se añaden de manera secuencial a la reacción y cuando se incorpora aquel complementario al ADN molde, se desencadena una cascada de reacciones que finaliza en la liberación de luz. Esta luz incide en el detector y se presenta como picos en un diagrama denominado pirograma. Las reacciones que tuvieron lugar en cada ciclo, utilizando como molde las perlas con el ADN, se detallan a continuación:

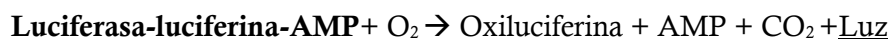
- a) Adición de dNTPs (fragmento Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*):



- b) Producción de ATP a partir del pirofosfato inorgánico (**ATP Sulfurilasa**):



- c) Producción de luz a partir del ATP (**Luciferasa**):

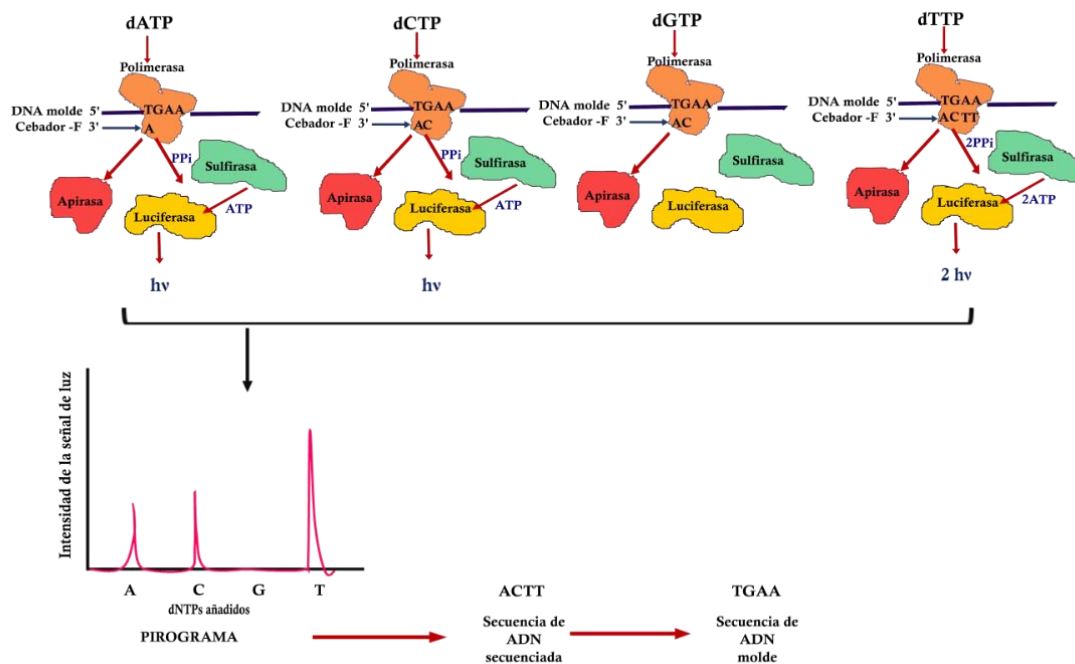


- d) Retirada de ATP y nucleótidos no incorporados (**Apirasa**):



La dispensación y el análisis de los SNPs se hizo en modo SNP utilizando el software PyroMark (Qiagen, GmbH).





**Figura 9.** Esquema de las reacciones químicas que tienen lugar en el proceso de pirosecuenciación (modificado de Ahmadian y cols., [206]).

## 7. Determinantes de virulencia

### 7.1. Presencia de genes asociados a virulencia y endemicidad

La presencia de los genes de virulencia *esp*, *hly* y *acm* se estudió en cada uno de los diferentes clones aislados por paciente mediante PCR convencional [43,207] siguiendo las indicaciones del apartado 6.2. Los cebadores y temperaturas de hibridación se describen en la tabla 6-fact virulencia-enterocinas.

### 7.2. Producción de bacteriocinas

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de sustancias de naturaleza peptídica producidas por bacterias lácticas que presentan capacidad antibacteriana frente a especies relacionadas. En el género *Enterococcus* su producción es un marcador de patogenicidad y ha demostrado conferir una ventaja ecológica frente a las que no las producen.

La producción de enterocinas se determinó mediante el método fenotípico descrito por del Campo y col. [208]. Para ello se inocularon 50 µl de un cultivo *o.n.* de la cepa indicadora en 5 ml de caldo tripton de soja suplementado con 0,5% de extracto de levadura y 0,7% de agar base (Difco, BD) por placa requerida. Esta suspensión se depositó sobre una placa que contenía 10 ml de agar tripton de soja (TSA) (Difco, BD) y, una vez solidificada, se inoculó con los distintos aislados de EfmRA mediante palillos estériles. Las placas se examinaron trascurridas 48 h de incubación a 37°C. Los aislados se consideraron productores de bacteriocinas cuando produjeron un halo de inhibición alrededor del punto de inoculación. Este ensayo no permite discriminar entre los aislados productores de una o múltiples bacteriocinas.

En primer lugar, se investigó la producción de bacteriocinas de todos los aislados de EfmRA frente a la cepa indicadora *E. faecalis* JH2-2. En segundo lugar, se seleccionó un

representante de cada uno de los clones detectados en base a los resultados de PFGE y se empleó como indicador frente al resto de clones estudiados. En ambos casos se utilizó como control positivo las cepas *E. faecium* L50 [209] y como control negativo *E. faecium* 217.

Posteriormente se determinó, en los aislados tomados como representantes de un clon, la presencia de genes que codifican para las bacteriocinas EntA, EntB, EntP, EntQ, Bac43, Bac32 y EntL50a/L50b mediante PCR siguiendo las indicaciones de los apartados 5.2.1., 5.2.2. y 5.2.3. Los cebadores y Tm empleadas se detallan en la tabla 6. Como controles positivos se emplearon los aislados de *E. faecium* L50 (control para las bacteriocinas EntL50a/L50b, EntP y EntQ) [209],

**Tabla 6.** Cebadores específicos y Tm empleadas en la amplificación de genes asociados a virulencia y bacteriocinas.

PCR	Gen	Tamaño (pb)	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Referencias
Factores asociados a virulencia	<i>esp</i>	510	esp-F	AGATTTCATCTTTGATTCTTGG	52	Vankerckhoven y cols., 2004
			esp-R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG		
	<i>hyl</i>	276	hyl-F	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	54	Vankerckhoven y cols., 2004
			hyl-R	GACTGACGTCCAAGTTTCAA		
	<i>acm</i>	470	acm-F	GGCCAGAAACGTAACCGATA	50	Nallapareddy y cols., 2008
			acm-R	AACCAGAAGCTGGCTTTGTC		
Enterocinas	<i>entA</i>	450	EntA-F	GTACCACTCATAGTGGA	50	Strompfová y cols., 2008
			EntA-R	GAGATTTATCTCCATAATCT		
	<i>entB</i>	158	EntB-F	GAAAATGATCACAGAATGCCTA	56	Strompfová y cols., 2008
			EntB-R	GTTGCATTAGAGTATACATTG		
	<i>entP</i>	215	EntP-F	ATGAGAAAAAATTATTAGITT	66	Strompfová y cols., 2008
			EntP-R	TTAATGTCCCATACCTGCCAAACC		
	<i>entQ</i>	677	EntQ-F	AGGGCTACTTGGATAGTACAC	52	Criado y cols., 2006
			EntQ-R	AACAAGAAAATTGCGGCTG		
	EntL50A/B	875	EntL50A/B-F	TCCCTACAGTCTCCCTTCC	56	Criado y cols., 2006
			EntL50A/B-R	TCTAGCGITAAGCCGAATG		
	Bac32	461	Bac32-F	AATGGTGAGTGTTGAAGC	56	Takako y cols., 2006
			Bac32-R	GAGTGATTATTTTCGCCGT		
	Bac43	575	Bac43-F	CGAAAAGGAAAAACAATCATG	50	Tokodoro y cols. 2006
			Bac43-R	TCCCATTTTCATTTTATTC		

## 8. Cambios en la microbiota intestinal

Los cambios en la composición de la microbiota intestinal durante el ingreso se evaluaron mediante PCR en tiempo real (**qPCR**). Para ello se seleccionaron 20 pacientes del estudio de manera aleatoria, pero, en función de su estado de colonización por EfmRA.

### 8.1. Selección de muestras

De cada uno de los pacientes se seleccionaron tres muestras de heces:

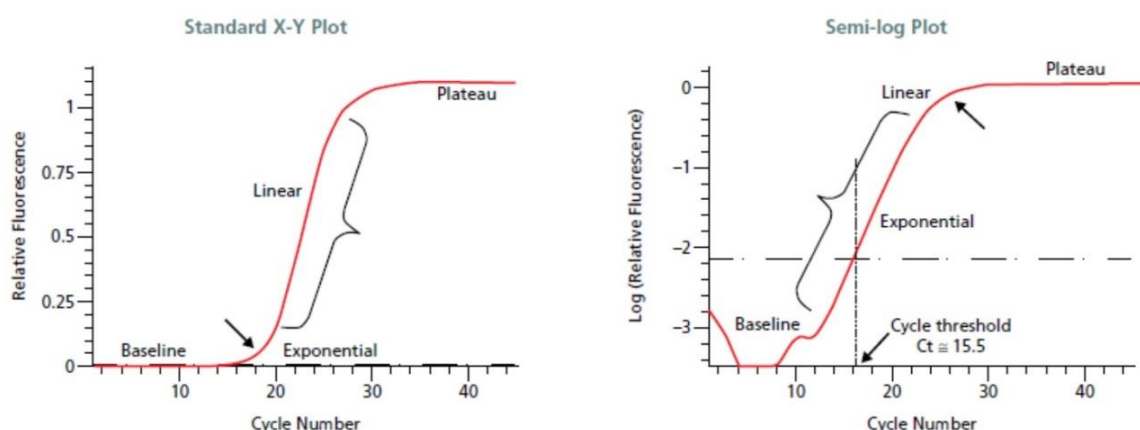
1. una tomada al ingreso (**muestra basal**);
2. una muestra representativa del periodo de PEL, recogida entre el día 1-5 de este periodo (**muestra PEL**);
3. una muestra representativa del periodo de Pos-PEL, recogida entre el día 1-5 tras la retirada de la profilaxis con levofloxacino (**muestra Pos-PEL**).

## 8.2. Extracción de ADN de muestras de heces

Para la extracción del ADN genómico total se utilizó el método comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH) siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando columnas de sílice. El ADN se eluyó en tampón TE.

## 8.3. PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR)

La PCR en tiempo real permite la amplificación de fragmentos de ARN o ADN y la detección simultánea del producto acumulado gracias a la incorporación de moléculas fluorescentes que se liberan de manera proporcional a la cantidad de fragmento amplificado. En cada ciclo de PCR este producto se va acumulando y rebasado un valor umbral (ciclo Ct), la fluorescencia aumenta de manera exponencial. La cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra inicial.



**Figura 9.** Diagramas de amplificación de una PCR en tiempo real (adaptado del manual de RT-PCR de Sigma-Aldrich). El gráfico de la izquierda representa la emisión de fluorescencia relativa frente al ciclo de amplificación y el de la derecha es la representación semi-logarítmica del anterior.

La abundancia de i) bacterias totales en heces, ii) bacterias del género *Enterococcus* y iii) *E. faecium* durante las distintas fases del estudio (Basal, PEL y Pos-PEL) se determinó mediante la amplificación y detección de secuencias diana de los genes 16S rADN, 23S rADN y *ddl* (que codifica para una D-ala: D-ala ligasa) respectivamente, empleando los cebadores y sondas Taq Man descritos previamente [210–212] (tabla 7).

### 8.3.1. Optimización de las PCR

Las condiciones de las PCRs de los genes diana (16S rADN, 23S rADN y *ddl*) empleadas en el estudio se optimizaron de la siguiente manera:

#### 8.3.1.1. Adecuación de las concentraciones de cebadores y sonda

Para determinar las concentraciones menores de cebadores y sonda para las que se detectaba un mayor incremento exponencial en la señal de fluorescencia se diseñaron 6 PCRs con las combinaciones de cebadores (c) y sonda (s) abajo indicadas (secuencias en tabla 7).

- a) 300 nM (c)- 50 nM (s)                      d) 600 nM (c)-50 nM (s)  
 b) 300 nM (c)-100 nM (s)                      e) 600 nM (c)-100 nM (s)  
 c) 300 nM (c)-150 nM (s)                      f) 600 nM (c)-150 nM (s)

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl, 10 µl de *master mix* (Gene expression Master Mix, Applied Biosystem,), 2 µl de muestra (ADN obtenido a partir de un cultivo *o.n.* de la cepa control *E. faecium* ATCC 19434 con el protocolo descrito en el apartado 5.2.1.) y volúmenes variables de agua, cebadores y sonda para obtener esas concentraciones. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador ABI Prism FAST-7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.). Las condiciones empleadas fueron: 2 min a 50°C; 10 min a 95°C; 40 ciclos de: 15 seg a 95°C y 1 minuto a 60°C (amplificación y detección).

**Tabla 7.** Tm, cebadores y sondas específicos empleados en el estudio de la microbiota intestinal mediante qPCR.

Gen diana	Cebadores y sonda	Secuencia (5'-3')	Referencia
<b>16S rADN</b>	Univ16S-F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	Nadkarni y cols., 2002
	Univ16S-R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCT	
	Univ16S-Pr	FAM-CGTATTACCGCGCTGCTGGCAC-TAMRA	
<b>23S rADN</b>	ECST784-F	AGAAATTCCAAACGAATTG	Frahm y cols., 2003
	ENC854-R	CAGTGGTCTACCTCCATCATT	
	GPL813T	FAM-TGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGGCTA-TAMRA	
<b>ddl</b>	Defm273.F	TGCTTTAGCAACAGCCTATCAG	Maheux y cols., 2011
	defm468-R	TAAACTTCTTCCGGCACTTCG	
	Defm-T1-F2-Pr	FAM-CTCGAGCAATCGTTGAACAAGGAATTG-BHQ-2	

### 8.3.1.2. Determinación de la eficiencia y coeficiente de correlación

Una vez seleccionadas las concentraciones óptimas de cebadores y sonda para la amplificación de cada uno de los tres genes seleccionados, se determinó la **eficiencia** (E) y **coeficiente de correlación** ( $R^2$ ) para cada una de las 3 PCRs (16S rADN, 23S rADN y *ddl*). Para ello se realizaron 5-6 diluciones seriadas en base diez del ADN extraído de un cultivo *o.n.* de *E. faecium* ATCC 19434 y la cantidad de ADN (ng/µl) de cada dilución se determinó espectrofotométricamente mediante el sistema NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

Se llevaron a cabo 3 PCRs independientes (gen 16S rDNA, 23S rDNA y *ddl*) usando las condiciones indicadas en el apartado 8.4.1.1. y empleando cada una de estas diluciones como ADN molde (2 réplicas para cada concentración). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que incluía: 10 µl de master mix (Gene expression Master Mix, Applied Biosystem), 3,4 µl de agua, 1 µl de cada pareja de cebadores a la concentración determinada en el apartado anterior (F+R), 3 µl de sonda, 0,4 µl de ROX (Applied Biosystems), 0.2 µl de BSA (Sigma-Aldrich, Missouri, EE.UU.) y 2 µl de ADN.

Se realizó una recta patrón para cada gen a partir de los Ct medios obtenidos para las diluciones estándares y a partir de ella se determinó el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y la eficiencia de cada reacción ( $E = \left[ \left( 10^{\left( -\frac{1}{m} \right)} - 1 \right) \right] 100$ , siendo m la pendiente de la recta).

### 8.3.3. Cuantificación relativa

Para analizar los cambios en la población bacteriana total y en la de *Enterococcus* spp. (*E. faecium* en particular), se empleó un análisis cuantitativo relativo en el que se comparó, para cada paciente seleccionado, la cantidad relativa de cada uno de los genes en las muestras de heces de las fases LEP y Pos-LEP con respecto a la muestra basal.

Para compensar cualquier diferencia en la cantidad de muestra y garantizar la comparación de cantidades de diana amplificadas procedentes de cantidades equivalentes de muestra se empleó como gen de referencia endógeno (normalizador) el gen de la RNAsa P (Applied Biosystems) empleando las concentraciones de sonda y cebadores previamente optimizadas en nuestro laboratorio para muestras de heces de pacientes oncológicos (400 nM (c) y 100 nM (s)).

La cuantificación relativa se realizó aplicando el método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) y los resultados se expresaron como la ratio de las cantidades relativas de las dianas en la PEL y en la Pos-PEL con respecto a la muestra basal, empleada como calibrador (figura 10). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos en un termociclador de tiempo real, ABI Prism FAST-7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) empleando las cantidades y condiciones descritas en el apartado 8.4.1.2. Los datos se analizaron con el software ABI Prism FAST-7500 (Applied Biosystems)

	Muestra		Calibrador
Genes diana	PEL	Pos-PEL	Basal
16S rADN	$Ct_{(16S-PEL)}$	$Ct_{(16S-Pos-PEL)}$	$Ct_{(16S-Basal)}$
23S rADN	$Ct_{(23S-PEL)}$	$Ct_{(23S-Pos-PEL)}$	$Ct_{(23S-Basal)}$
<i>ddl</i>	$Ct_{(ddl-PEL)}$	$Ct_{(ddl-Pos-PEL)}$	$Ct_{(ddl-Basal)}$
Gen referencia			
RNAsa P	$Ct_{(RNAsa P-PEL)}$	$Ct_{(RNAsa P-Pos-PEL)}$	$Ct_{(RNAsa P-Basal)}$

Método de Livack
$\Delta Ct_{(muestra)} = Ct_{(diana, muestra)} - Ct_{(referencia, muestra)}$ $\Delta Ct_{(calibrador)} = Ct_{(diana, calibrador)} - Ct_{(referencia, calibrador)}$ $\text{Ratio de expresión normalizada} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

**Figura 10.** Esquema simplificado del método de Livack aplicado para el cálculo de la cantidad relativa de cada una de las dianas en las muestras de heces del ingreso (PEL y Pos-PEL) con respecto a la muestra basal.

## 9. Análisis estadístico

Los datos recogidos en este estudio se analizaron con el programa estadístico STATA™, versión 11.0 (StataCorp LP, Texas, USA). Para establecer la asociación estadística entre las variables clínico-demográficas y la colonización por EfmRA se aplicaron los test de Fisher o Chi-cuadrado para las variables cualitativas. Cuando los datos que se compararon fueron medias o rangos, se aplicó el test *t*- Student de muestras independientes o el test *U* de Mann Whitney, respectivamente.

El nivel de significación estadística se estableció en 0,05 salvo cuando se llevaron a cabo comparaciones múltiples sobre la misma variable, como ocurrió al explorar los factores de riesgo de adquisición de colonización durante la PEL y la Pos-PEL. En este caso se aplicó la corrección de Bonferroni y se disminuyó el nivel de significación estadística a 0,025 para disminuir el efecto negativo de la multiplicidad de contrastes sobre el error de tipo I.

Para comprar las tasas de colonización entre los periodos del estudio (Basal *vs* PEL y Basal *vs* PEL) se empleó el test de McNemar que permite comparar y establecer si existe una asociación significativa entre proporciones de muestras u observaciones que están relacionadas (como ocurre con el estado de colonización de un paciente en tres momentos distintos de su estancia hospitalaria).





## RESULTADOS

### 1. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes

Durante el periodo de estudio (3 años) 163 pacientes cumplieron los criterios de inclusión y se les ofreció la posibilidad de participar en el ensayo. De ellos 113 firmaron el consentimiento informado y fueron reclutados, aunque de éstos sólo 52 se incluyeron finalmente en el estudio. Los motivos de exclusión fueron: la ausencia de una muestra fecal basal (n=30), pérdida de seguimiento por traslado a otro centro/fallecimiento (n=27) o administración de antibióticos beta-lactámicos durante la PEL (n=4). De estos 52 pacientes se estudiaron un total de 63 episodios de neutropenia (EN), ya que 8 de ellos participaron durante más de una fase de tratamiento ( $\geq 2$  EN): 6 con 2 EN y 2 pacientes con 3 EN.

Los pacientes incluidos fueron en su mayoría hombres (n=30, 57,6%) con una edad media de  $47 \pm 15,6$  años, y en su mayoría diagnosticados de leucemia mieloide aguda (LMA, n=27). Cabe destacar que algo más de la mitad de estos pacientes (55,7%; 29/52) habían permanecido hospitalizados en este u otro hospital durante el mes previo a la participación en este estudio. Las principales características clínico-epidemiológicas de los pacientes y de su ingreso aparecen recogidas en la tabla 7.

**Tabla 7.** Características clínicas y demográficas de los pacientes y de los episodios de neutropenia estudiados.

Característica	Valor
Nº de pacientes/1 <sup>er</sup> EN	52
Edad media (SD)	47 (15,6)
Género: hombre/ mujer, nº	30/22
Enfermedad hematológica, nº	
Leucemia mieloide aguda	27
Leucemia linfoblástica aguda	5
Linfoma no-Hodgkin	6
Mieloma múltiple	7
Linfoma Hodgkin	4
Otras <sup>1</sup>	3
Nº de pacientes sometidos a TPH <sup>2</sup>	31
Nº de EN estudiados (total)	63
Nº de pacientes con $\geq 2$ EN	8
Nº medio de EN por paciente	1.2
Duración (días) del EN (mediana, rango)	39 (8-96)
Duración (días) neutropenia (mediana, rango)	15 (9-26)
Duración (días) de la PEL (mediana, rango)	11 (9-15)
Nº de muestras de heces procesadas	482
Nº de muestras de heces estudiadas por EN (mediana, rango)	7 (5-9)
Hemocultivos extraídos por ingreso (mediana, rango)	7 (3-11)

**Abreviaturas:** EN, episodio de neutropenia; TPH, trasplante de precursores hematopoyéticos; PEL, profilaxis extendida con levofloxacino.

<sup>1</sup>Incluye un paciente con mielofibrosis, uno con leucemia bifenotípica aguda y con leucemia mieloide crónica.

<sup>2</sup>Estos pacientes recibieron además de PEL, profilaxis con cotrimoxazol en la fase de TPH.



## 2. Infecciones clínicas

Durante el seguimiento clínico se extrajeron 212 parejas de hemocultivos y se documentaron microbiológicamente 22 episodios de bacteriemia con relevancia clínica. De estos EfmRA fue la tercera causa más frecuente de bacteriemia ( $n=4$ ; 18,2% del total de episodios de bacteriemia) por detrás de los estafilococos coagulasa-negativos ( $n=8$ ; 36,6%) y *E. coli* ( $n=6$ ; 27,2%).

Los episodios de bacteriemia originados por EfmRA se detectaron en un 7,7% del total de pacientes que se correspondieron con 12,5% (4/32) de los colonizados a nivel intestinal por este microorganismo. Sin embargo, la asociación entre la colonización intestinal y el posterior desarrollo de bacteriemia por EfmRA no se demostró estadísticamente significativa (Test de Fisher,  $p=0,151$ ).

Los episodios de bacteriemia producidos por EfmRA tuvieron lugar en pacientes colonizados, durante la fase de pos-profilaxis (Pos-LEP) y tras la administración de quimioterapia de inducción a la remisión. En todos los casos el clon detectado en el episodio de bacteriemia fue idéntico al que se aisló en las heces, confirmando su origen intestinal. El tiempo medio transcurrido desde el aislamiento del clon de EfmRA en las heces de un paciente y el desarrollo de bacteriemia fue de  $29,5 \pm 12$  días.

No se documentó ninguna otra infección clínica producida por EfmRA durante el periodo de estudio.

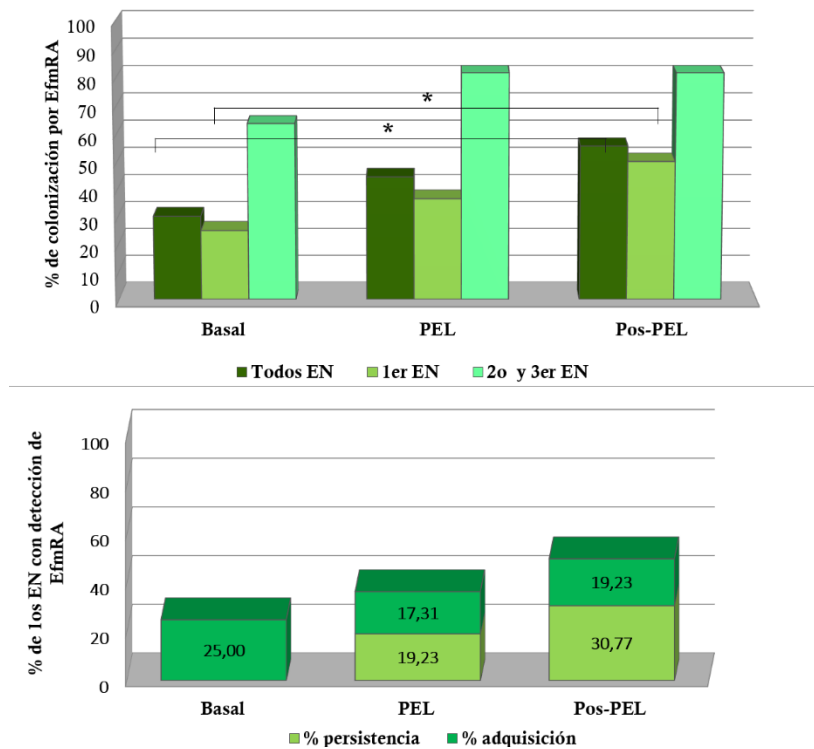
## 3. Dinámica de colonización de EfmRA

Durante los tres años del estudio se procesaron 482 muestras de heces y se detectó colonización en 197 muestras (40,8%). Esto se correspondió con la detección de colonización intestinal por EfmRA en un 61,4% (32/52) de los pacientes.

Las tasas de colonización se incrementaron de forma gradual durante la estancia hospitalaria durante el primer EN estudiado: 25% (13/52) en la fase Basal, previo a la administración de quimioterapia; 36,6% (19/52) durante la PEL y fueron máximos en la fase Pos-PEL 50% (26/52) (figura 11a). El incremento en la colonización detectado en la fase de Pos-PEL con respecto a la basal del primer EN fue estadísticamente significativo (McNemar,  $p=0,004$ ). En este sentido, cabe reseñar que algo más de dos tercios (61,5%; 8/13) de los pacientes en los que se detectó colonización basal habían tenido al menos un ingreso en el mes previo a la participación en este estudio.

Cuando se estudiaron de manera global todos los episodios de neutropenia, sin diferenciar entre el primero o sucesivos, se observaron tasas de colonización algo superiores a las arriba descritas. Por el contrario, al realizar este análisis incluyendo sólo los segundos o terceros EN, las tasas de colonización fueron muy superiores a las del primer EN y estuvieron comprendidas entre el 60 y el 80% (Figura 11a). Esta observación está en consonancia con las elevadas tasas de persistencia de colonización encontradas durante el primer EN, que fueron una característica común a la mayoría de pacientes colonizados (78.1%, 25/32) (figura 11b).

No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de adquisición de colonización de EfmRA en los periodos de PEL y Pos-PEL ( $p=0,01$ ).



**Figura 11.** a) Tasa de colonización por EfmRA previa a la administración de profilaxis (Basal), durante la PEL y tras su retirada (Pos-PEL); b) Tasas de adquisición y persistencia de colonización por EfmRA durante el primer EN en los diferentes sub-periodos, \*  $p < 0,025$ .

#### 4. Factores de riesgo de colonización por EfmRA

Inicialmente se llevó a cabo un análisis exploratorio para determinar qué variables se asociaban significativamente y de manera independiente con un mayor riesgo de adquisición de colonización por EfmRA durante las fases de PEL y Pos-PEL. Las variables estudiadas y su asociación con la colonización por EfmRA aparecen recogidas en la tabla 8.

Este análisis puso de manifiesto que la duración de la neutropenia, la presencia de mucositis y la fase de inducción de la quimioterapia eran factores de riesgo independientes para colonizarse por EfmRA durante la fase de pos-PEL (corrección de Bonferroni,  $p < 0,025$ ) (tabla 8). Por el contrario, ninguna de las variables estudiadas pudo asociarse de manera significativa con el riesgo de adquirir colonización por EfmRA durante la PEL. Sin embargo, y pese a carecer de significación estadística, este análisis reveló que los pacientes que recibieron profilaxis con cotrimoxazol de manera concomitante con la PEL se colonizaron menos que aquellos que recibieron PEL de manera aislada (50% vs 78%).

El diseño del estudio y la ausencia de un grupo control sin administración de PEL condicionaron el análisis del estudio, no pudiéndose llevar a cabo un análisis multivariable con aquellas variables que mostraron una asociación estadística durante el análisis univariable y descartar posibles factores de confusión.

**Tabla 8.** Análisis de las variables asociadas con la colonización de los pacientes por EfmRA durante los periodos de PEL y Pos-PEL.

Variable independiente	Variable dependiente					
	Colonización de pacientes (n=52) por EfmRA durante:					
	PEL			Pos-PEL		
	colonizados n= 19	no colonizados n= 33	p	colonizados n= 26	no colonizados n= 26	p
Género (hombre), n (%)	12 ( 40)	18 (60)	0,366	16 (53,3)	14 (46,7)	0,623
Edad (años), media (SD)	50,1 (14,8)	46 (16)	0,360	47,3 (16,5)	47 (14,9)	0,912
Ingresos previos, n (%)	13 ( 44,8)	16 (55,2)	0,154		NA	
Duración del ingreso (días), mediana (rango)		NA		52 (27-84)	34 (26-36)	0,056
Fase de la quimioterapia (inducción), n (%)	6 ( 37,5)	10 ( 62,5)	0,194	10 (62,5)	6 (37,5)	<u>0,002</u>
Quimioterapia con citarabina, n (%)	7 (28)	18 (72)	0,219	12 (48)	13 (52)	0,781
Mucositis (sí), n (%)	11 (32,4)	23 (67,6)	0,389	13 (38,2)	21 (61,8)	<u>0,020</u>
Profilaxis con cotrimoxazol, n (%)	8 (26,6)	22 (73,3)	0,084		NA	
Duración de la PEL (días), mediana (rango)	14 (6-21)	11 (9-15)	0,248	11,5 (6-20)	11 (10-15)	0,883
Neutropenia febril (sí), n (%)		NA		21 (46,6)	24 (53,4)	0,315
Duración de la neutropenia (días), mediana (rango)		NA		18,5 (9-26)	10 (8-17)	<u>0,018</u>
Administración de ATBs de amplio espectro:						
Meropenem, n (%)		NA		17 (47,2)	19 (52,8)	0,548
Vancomicina, n (%)		NA		12 (40)	18 (60)	0,092
Amikacina, n (%)		NA		10 (58,8)	7 (41,2)	0,375
Piperacilina / tazobactam, n (%)		NA		17 (54,8)	14 (45,2)	0,397

Abreviaturas: NA, no aplica; ATBs, antibióticos; \*,  $p < 0.025$  asociación estadísticamente significativa (corrección de Bonferroni)

## 5. Estructura poblacional y diversidad clonal de EfmRA

### 5.1. PFGE y MLST

Los 193 aislados de EfmRA recuperados de 452 muestras de heces en este estudio se agruparon en 24 pulsotipos diferentes (A-X), mediante inspección visual y 13 secuencias tipo (STs) (tabla 9). Estas 13 ST se distribuyeron en los grupos BAPS 1 (1 ST; 0,5 % aislados), BAPS 2 (7 STs; 67,4 % de los aislados), BAPS 3 (4 STs; 31,6 % de los aislados) y BAPS 7 (1ST; 0,5 % de los aislados). Algo menos de la mitad de estas ST (6/13) se correspondieron con los subgrupos de BAPS 2.1a y 3.3a y agruparon a la práctica totalidad de los aislados (n=183; 94,8%). Estos subgrupos suelen considerados clones de alto riesgo y su adquisición se relaciona con el medio hospitalario [165,166].

El clon EfmRA-ST117 (BAPS 2.1a), se asoció con los patrones de campo pulsado (PFGE) B, E y N y fue el clon más frecuentemente detectado en este estudio (36,5% de los pacientes). Asimismo, este fue el clon que se aisló en todos los episodios de bacteriemia producidos por *E. faecium* (n=4, EfmRA-ST117- B y EfmRA-ST117-N) y coincidió, en todos los casos, con el clon detectado en ese periodo en las heces del paciente.

El clon EfmRA-ST17 (BAPS 3.3a) se aisló en 21% de los pacientes y mostró una mayor variabilidad en los patrones de PFGE (D, G, H, O, Q, T and U). El resto de clones se detectaron de manera aislada y esporádica durante el periodo de seguimiento.

**Tabla 9.** Diversidad clonal, presencia de genes asociados a virulencia y co-resistencias de los aislados de EfmRA de colonización y muestras clínicas.

BAPS <sup>1</sup>	ST (mlst)	PFGE	N° de pacientes	N° de EN	N° de aislados	Genes de virulencia (%)			Perfil de resistencia ATB
						<i>esp</i>	<i>hyl</i>	<i>acm</i>	
1.2	685	F	1	2	2	0	0	100	E
2.1a	117	B,E,N <sup>2</sup>	19	23	115 (4 AB)	100	14,3	100	Levo, Ran-St (98.3%), Ran-G (16.8%), E
2.1a	203	K, M	2	2	11	100	0	100	Levo, Ran-St (80%), Ran-G (54.5%), E, QD (20%)
2.1b	650	S	1	1	3	0	0	100	Levo, Ran-St, E, QD
2.1b	418	L	1	1	1	0	100	100	Levo, E
2.3b	1	X	1	1	1	0	0	100	Levo, Ran-St, E
2.3b	264	I	1	1	1	0	0	100	Levo, Ran-St, E
2.3b	539	P	1	1	1	0	0	100	Ran-St, E, QD
3.1	22	R	1	1	1	0	0	100	Levo, Ran-St, E
3.2	29	V	1	1	1	0	0	100	Levo, Ran-St, E, QD
3.3a	17	D,G,H,O,Q,T,U	12	15	57	46,6	93,3	100	Levo, Ran-St, Ran-G (21%), E, QD (14,2%)
3.3a	18	A,C,J	1	3	3	33,3	66,6	100	Levo (33.3%), Ran-St (66.6%), Ran-G (33.3%), E, QD (33,3%)
7.3	272	W	1	1	1	0	0	100	Levo, Ran-St, E

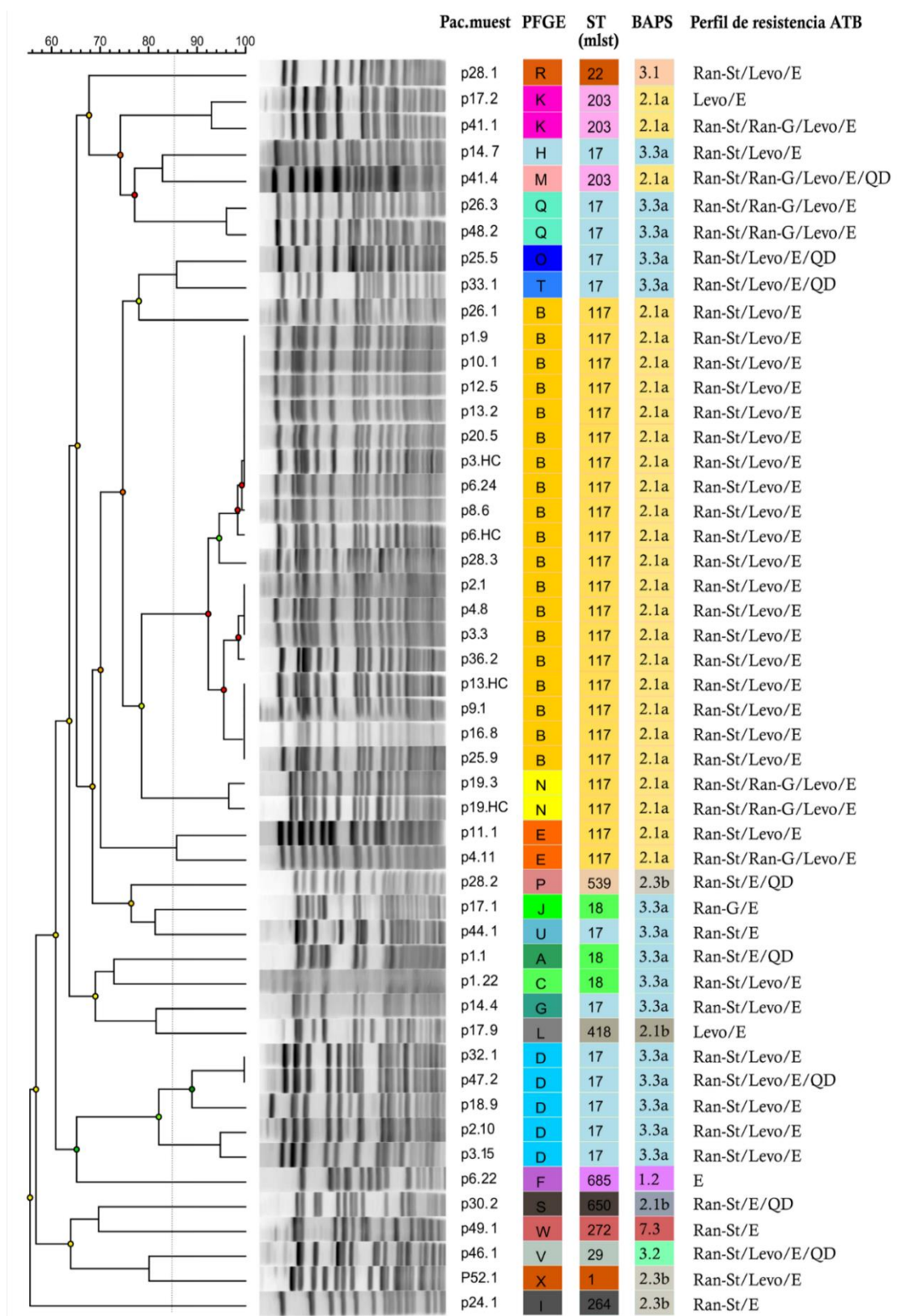
<sup>1</sup> BAPS, Subgrupos de *E. faecium* basados en el análisis bayesiano de la estructura poblacional propuesto por Willems y cols. (Mbio 2012) y Tedim y cols. (App Environ Microbiol 2015).

<sup>2</sup> Dos aislados de colonización pertenecientes al clon EfmRA-N presentaron resistencia a linezolid

Para confirmar el análisis visual de los patrones de campo pulsado se empleó el método UPGMA para el análisis de los patrones de bandas de cada uno de los diferentes perfiles de campo pulsado detectados por paciente (figura 12) permitió agrupar con más de un 85% de similitud al 94,7% (18/19, 15/19 fueron aislados idénticos y 3/19 se consideraron altamente relacionados) de los aislados designados como clon ST117-B en el análisis visual. Los clones EfmRA-ST117-N (2/2) y EfmRA-ST117-E (2/2) se agruparon como clones independientes. Los aislados clasificados como EfmRA-ST17-D se subdividieron en dos clones diferentes mediante esta herramienta.

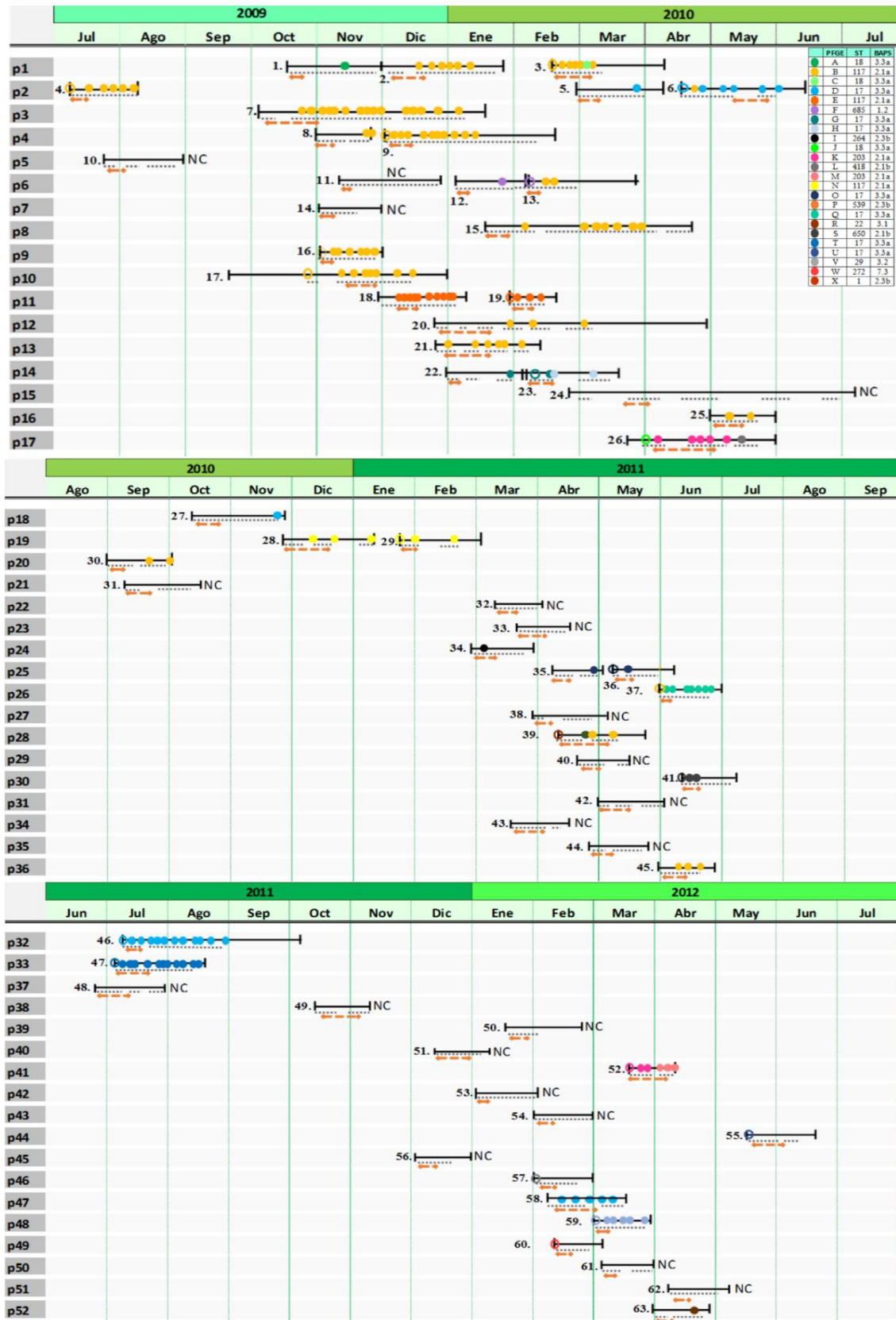
A lo largo del periodo de estudio se observó un cambio en la dinámica de colonización por EfmRA de los pacientes hematológicos. Durante los dos primeros años, 2009 y 2010, el clon predominante fue EfmRA-ST117, que se detectó en 66,7% (14/21) de los pacientes incluidos en esos años. Sin embargo, a partir del 2011 se detectó una transición ecológica, desplazándose el clon EfmRA-ST117 por el clon EfmRA-ST17 que colonizó al 22,5 % (7/31) de los pacientes reclutados a lo largo del 2011. La figura 13 representa la dinámica de colonización, la adquisición y persistencia y reemplazo clonal que tuvo lugar durante los distintos EN de los pacientes que participaron en el estudio.

Cuando se estudió la diversidad clonal de manera global en cada uno de los sub-periodos del estudio se observó una importante reducción de ésta a lo largo del tiempo. Así, el índice de diversidad de Simpson ( $D_i$ ), fue de 0,92 en la fase Basal, de 0,87 durante la profilaxis extendida con levofloxacino y de 0,76 en la fase de pos-profilaxis. Esta observación es consistente con la persistencia de determinados clones a nivel intestinal, principalmente EfmRA-ST117 y el remplazo de otros como EfmRA-ST685, EfmRA-ST264, EfmRA-ST418 o EfmRA-ST239.



**Figura 12.** Dendrograma de los distintos clones aislados por paciente obtenido mediante el método UPGMA, clasificados mediante las distintas herramientas de tipado (PFGE, MLST y BAPS) y perfil de resistencia antibiótica de los aislados.





**Figura 13.** Dinámica de colonización de EfmRA a lo largo de los tres años del estudio. Las líneas continuas representan la duración de la estancia hospitalaria y el número delante de cada una de ellas hace referencia al episodio de neutropenia asignado en el estudio.

Las líneas discontinuas inmediatamente debajo indican los periodos reales de muestreo y la longitud de las flechas naranjas representa la duración de la PEL. Los diferentes clones de *E. faecium* se representan mediante bolas de colores, cuando la colonización es durante el episodio o como anillas de colores, para representar la colonización basal. En esta figura se aprecia la predominancia y persistencia de los clones de EfmRA-ST117 durante los años 2009 y 2010 y su disminución y reemplazo en este grupo de pacientes, por otros clones a partir del año 2011.

## 5.2. Sistema Phene Plate™ (PhP System)

### 5.2.1. Diversidad genética y análisis de clasificación cruzado

La diversidad de nuestra población de *E. faecium* (n=197) varió en función del nivel de similitud empleado para la clasificación de aislados mediante el PhP. Cuando se emplearon los niveles de similitud 0,975 y 0,95 se obtuvieron índices de diversidad muy similares y superiores al obtenido mediante PFGE (tabla 10). Teniendo en cuenta únicamente los valores del índice de diversidad de Simpson ( $D_i$ ) esto indicaría que la técnica PhP es más discriminatoria que el PFGE, considerada como la técnica de referencia frente al que se compara, cuando se emplean niveles de similitud iguales o superiores a 0,95.

**Tabla 10.** Poder discriminatorio del PhP y PFGE para los distintos niveles de similitud comparados.

Técnica	Nivel de similitud	Nº tipos identificados (patrones únicos)	Índice de Diversidad
PhP	0,975	38 (19)	0,886
	0,95	27 (12)	0,869
	0,9	19 (7)	0,686
PFGE	≤3 bandas	24	0,743

La reproducibilidad de la técnica se verificó mediante el ensayo por duplicado de 14 aislados de *E. faecium* (10 seleccionados del estudio de colonización y 3 pertenecientes al clon sueco FMSE1 y *E. faecium* ATCC 51559) intra e inter-ensayo. En todos los casos, los perfiles se mantuvieron estables a tiempo final (transcurridas 60 h de incubación).

La clasificación cruzada de los aislados, basada en los acuerdos y desacuerdos obtenidos por PhP y PFGE demostró que la concordancia entre ambas técnicas dependía, en gran medida, del índice de similitud elegido. Aunque el acuerdo relativo entre ambas técnicas fue bueno (0,82-0,85), con independencia del grado de similitud seleccionado, no lo fue tanto cuando se tuvo en cuenta el efecto del azar (Pe). Basándonos en los valores del índice de kappa, el acuerdo entre ambos métodos fue moderado (0,41-0,6) cuando los índices de similitud se establecieron en 0,975 ó 0,95 y buena, para el índice de similitud de 0,9 (tabla 11).

Los resultados del análisis cruzado fueron muy semejantes para los índices de similitud 0,975 y 0,95. En ambos casos se observó que el tipo de PhP fue mejor predictor del patrón de PFGE

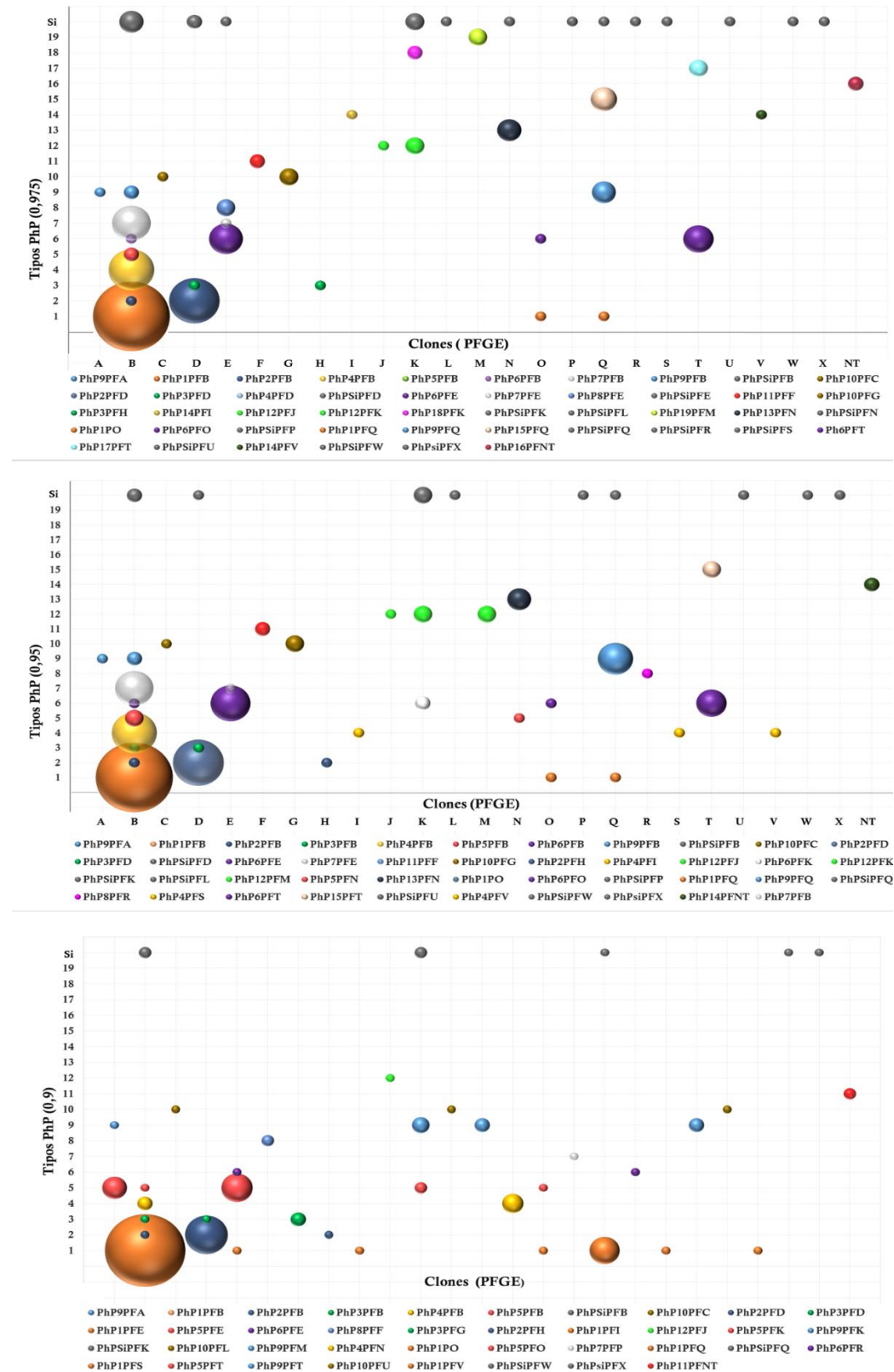
que a la inversa: algo menos de la mitad (40 y 42% respectivamente) de todas las parejas de aislados con el mismo patrón de PFGE se agruparon dentro del mismo tipo de PhP, mientras que cerca del 80% (80,7% y 78% respectivamente) de las parejas de aislados que se agruparon dentro del mismo tipo de PhP, compartieron además el patrón de PFGE (figura 14). Por el contrario, cuando se seleccionó el índice de similitud de 0,9 para el análisis se invirtió esta observación, encontrándose que 83% de las parejas de aislados que compartieron PFGE, compartieron además el tipo de PhP y sólo 0,66% a la inversa.

**Tabla 11.** Resultados del análisis de clasificación cruzado de todas las parejas de aislados de EfmRA posibles en función del acuerdo o desacuerdo entre PFGE y PhP con tres niveles de similitud distintos (0,975; 0,95 y 0,95).

PhP (0,975)	PFGE		
	Acuerdos	Desacuerdos	Total
Acuerdos	1929	459	2388
Desacuerdos	2899	14019	16918
Total	4828	14478	19306
<b>Acuerdo relativo:</b> $P(a) = [Pm (P_{hP,PFGE}) + Pmm (P_{hP,PFGE})] / n = 0,83$			
<b>Acuerdo por azar:</b> $P(b) = [Pm (P_{hP}) * Pm (P_{PFGE})] + [Pmm (P_{hP}) * Pmm (P_{PFGE})] = 0,69$			
$\kappa = 0,44$			
PhP (0,95)	PFGE		
	Acuerdos	Desacuerdos	Total
Acuerdos	2025	568	2593
Desacuerdos	2803	13910	16713
Total	4828	14478	19306
<b>Acuerdo relativo:</b> $P(a) = [Pm (P_{hP,PFGE}) + Pmm (P_{hP,PFGE})] / n = 0,82$			
<b>Acuerdo por azar:</b> $P(b) = [Pm (P_{hP}) * Pm (P_{PFGE})] + [Pmm (P_{hP}) * Pmm (P_{PFGE})] = 0,68$			
$\kappa = 0,45$			
PhP (0,90)	PFGE		
	Acuerdos	Desacuerdos	Total
Acuerdos	4021	2063	6084
Desacuerdos	807	12415	13222
Total	4828	14478	19306
<b>Acuerdo relativo:</b> $P(a) = [Pm (P_{hP,PFGE}) + Pmm (P_{hP,PFGE})] / n = 0,85$			
<b>Acuerdo por azar:</b> $P(b) = Pm (P_{hP}) * Pm (P_{PFGE}) + Pmm (P_{hP}) * Pmm (P_{PFGE}) = 0,59$			
$\kappa = 0,63$			

El valor del índice kappa ( $\kappa$ ) refleja el acuerdo entre ambas técnicas. Abreviaturas: Pm, probabilidad de que exista un acuerdo (*match*); Pmm, probabilidad de que exista un desacuerdo (*mismatch*).





**Figura 14.** Diagramas que muestran la concordancia entre la tipificación molecular mediante PFGE y la tipificación fenotípica mediante el PhP para los valores de similitud 0,975; 0,95 y 0,9 (de arriba abajo). El tamaño de las bolas es proporcional al número de aislados para cada tipo.

### 5.2.2. Perfiles de utilización de azúcares

Los perfiles numéricos, resultado del grado de metabolización de los distintos azúcares incluidos en el esquema de tipado de PhP, se desglosaron para examinar el grado de utilización individual de estos sustratos.

La gran mayoría de estos aislados (> 95%) fueron capaces de hidrolizar en alto grado (alta utilización: 0-8) más de la mitad de los sustratos incluidos en este sistema de tipificación (12/23): ribosa (100%), L-alanina (97,9%), maltosa (100%), trehalosa (99,4%), sacarosa (95,4%), lactosa (99,5%), melobiosa (95,9%), lactulosa (99,4%), gentobiosa (97,9%), manitol (100%), arbutina (98,9%) y  $\beta$ -metil glucósido (99,4%). Ésto puede ser indicativo de la existencia de rutas metabólicas comunes a esta especie que se expresan de manera constitutiva con independencia del grado de diversidad de la población de estudio. De igual manera, más del 90% de los aislados no demostró capacidad para metabolizar *in vitro*, o sólo lo hizo en bajo grado (17-24), los sustratos D-Xilosa, melecitosa, almidón y gluconato.

En contraste con estos resultados, se observó que la metabolización de determinados azúcares (como el inositol, sorbitol y glicerol o la rafinosa, la amigdalina y la tagatosa) pareció ser dependiente de la cepa estudiada, aunque se observaron variaciones intraclon. Así, sólo los aislados pertenecientes al clon dominante y persistente EfmRA-ST117-B (BAPS 2.1a) fueron capaces de metabolizar simultáneamente, en alto o medio grado, los polioles inositol (89/94; 94,6%), sorbitol (74/94; 78,7%) y glicerol (94/94; 100%). De igual manera, sólo un reducido número de aislados incluidos en los BAPS 2.1a y 3.3a exhibieron capacidad de metabolizar la rafinosa en alto grado (13/15, EfmRA-ST117-E; 6/6 EfmRA-ST117-N y 3/8 EfmRA-ST203-K; 25/25 EfmRA-ST17-D; 1/1 EfmRA-ST17-H; 1/2 EfmRA-ST17-O). El hecho de que la capacidad de metabolizar un azúcar no sólo sea dependiente de cepa, sino que pueda variar entre aislados, pertenecientes al mismo clon pero de distintos pacientes, podría sugerir la posibilidad de que los genes que codifican algunas de las enzimas involucradas en las rutas catabólicas de estos sustratos se adquieran por transferencia horizontal.

Es destacable el hecho de que únicamente los clones pertenecientes a los linajes asociados al medio ambiente hospitalario (BAPS 3.3a y 2.1a) fueron capaces de metabolizar el sorbitol, con la excepción de los clones EfmRA-ST17-D y EfmRA-ST-117-N. Esta característica podría ser importante para la supervivencia de estas cepas en el ambiente hospitalario, aunque esta afirmación requeriría la comprobación molecular de la existencia de rutas responsables de la hidrólisis de este azúcar y su localización genética. Con la excepción del sorbitol, no se encontró ninguna asociación entre los subgrupos BAPS y la metabolización de alto grado de alguno de estos azúcares.

## 6. Características microbiológicas de EfmRA

### 6.1. Resistencia antibiótica

Todos los clones fueron resistentes a la eritromicina y todos, con la excepción de los pertenecientes a las secuencias tipo ST685, ST539 y ST18, presentaron además resistencia a levofloxacino. La resistencia de alto nivel a estreptomicina ( $>1.000$  mg/L) se detectó en la mayoría de los clones, mientras que sólo un reducido número de los clones pertenecientes a las ST203, ST17 y ST117 presentaron resistencia de alto nivel a gentamicina ( $>500$  mg/L) (tabla 9). Todos los aislados, tanto de colonización como de episodios de bacteriemia, fueron sensibles a vancomicina ( $\leq 1$  mg/L), teicoplanina ( $\leq 2$  mg/L) y daptomicina ( $\leq 1$  mg/L). De igual manera, todos los aislados fueron sensibles a linezolid ( $\leq 1$  mg/L), salvo dos pertenecientes al clon EfmRA-ST117-N (ver apartado 7. Emergencia de resistencia a linezolid *in vivo*).

### 6.2. Factores asociados a virulencia y producción de bacteriocinas

El gen *esp* se detectó en todos los aislados pertenecientes al clon EfmRA-ST203 y EfmRA-ST117 (BAPS 2.1a) y en aproximadamente la mitad de los pertenecientes al clon EfmRA-ST17 (BAPS 3.3a). (46,6%). Por el contrario, el gen *hly* solo se detectó de manera esporádica en los aislados pertenecientes al clon EfmRA-ST117 y en la práctica totalidad de aislados del clon EfmRA-ST17 (93,3%). La presencia del gen *acm* se detectó en todos los aislados de EfmRA del estudio (tabla 9).

La producción de bacteriocinas *in vitro* frente a la cepa de referencia *E. faecalis* JH2-2 no fue homogénea dentro de un determinado clon y sólo se demostró en un reducido número de aislados de EfmRA perteneciente a los clones EfmRA-ST17 [D (2/25), G (3/3), H (1/1), Q (7/12)], EfmRA-ST117 (B (23/95), EfmRA-ST203 [(M (3/3), K (6/8)] y EfmRA-S685 [F (1/1)].

Cuando se investigó la producción de bacteriocinas *in vitro* empleando un representante de cada clon de EfmRA como cepa indicadora se puso de manifiesto que sólo un 41,6% (10/24) de los clones seleccionados era capaz de producirlas e inhibir el crecimiento de otros aislados. La práctica totalidad de los clones productores de bacteriocinas (8/10) se agruparon en los grupos BAPS 2.1a (3/10) y 3.3a (5/10) y pertenecieron a las secuencias tipo ST17 (clones C, G, H, J y Q) ST18 (clon J), ST203 (clones K y M), ST117 (clon B).

Ninguno de los clones seleccionados, ni la cepa control *E. faecium* L50, fueron capaces de producir bacteriocinas *in vitro* frente al clon EfmRA-ST117-B, que resultó ser el clon más prevalentemente detectado en colonización (figura 15).

La detección molecular de los genes que codifican para las bacteriocinas reveló que la enterocina A estaba ampliamente distribuida en la selección de clones (18/24; 75%). Por otra parte, todos los clones que produjeron bacteriocinas *in vitro*, con la excepción de EfmRA-ST203-M, albergaron el gen que codifica para la bacteriocina Bac43. En ninguno de estos clones se detectó la presencia de los genes que codifican para las bacteriocinas EntQ ni EntL50a/b

Cepa problema	Aislado	PFGE	ST	BAPS	Bacteriocinas (PCR)							Cepa indicadora (PFGE)																								
					A	B	P	Q	L50	Bac32	Bac43	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	
					-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	p6.22	F	685	1.2	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	p2.1	B	117	2.1a	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	p11.1	E	117	2.1a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p19.3	N	117	2.1a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p17.2	K	203	2.1a	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	p41.4	M	203	2.1a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	p17.9	L	418	2.1b	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	p30.2	S	650	2.1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p52.5	X	1	2.3b	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	p24.1	I	264	2.3b	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p28.2	P	539	2.3b	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p28.1	R	22	3.1	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p46.1	V	29	3.2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p32.1	D	17	3.3a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p14.6	G	17	3.3a	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	p14.7	H	17	3.3a	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	p25.5	O	17	3.3a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p26.3	Q	17	3.3a	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	p33.2	T	17	3.3a	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p44.1	U	17	3.3a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p1.5	A	18	3.3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	p1.22	C	18	3.3a	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	p17.1	J	18	3.3a	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	p49.1	W	272	7.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Controles	E. faecium L50				-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	E. faecium 217				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

**Figura 15.** Presencia de genes que codifican las bacteriocinas EntA, EntB, EntQ, EntP, EntL50, Bac32 y Bac43 en los diversos clones de EfmRA detectados durante el estudio (un representante por clon) y detección de la producción de bacteriocinas *in vitro* empleando cada uno de los clones como cepa indicadora y el resto como problema. Los recuadros grises en la parte derecha de la tabla indican el enfrentamiento de la misma cepa como indicadora y problema.

## 7. Emergencia de resistencia a linezolid *in vivo*

### 7.1. Descripción del caso clínico

Un varón adulto de 69 años acudió al servicio de urgencias del Hospital Universitario Ramón y Cajal con un cuadro clínico de pancitopenia e ingresó en el servicio de Hematología con un diagnóstico de leucemia mieloide aguda. Siguiendo los protocolos clínicos de nuestro hospital, se le administró PEL (500 mg/ 24 h v.o.) desde el ingreso (día 0) y 10 días después, inició el primer ciclo de inducción de quimioterapia con idarubicina-citarabina-panobinostat.

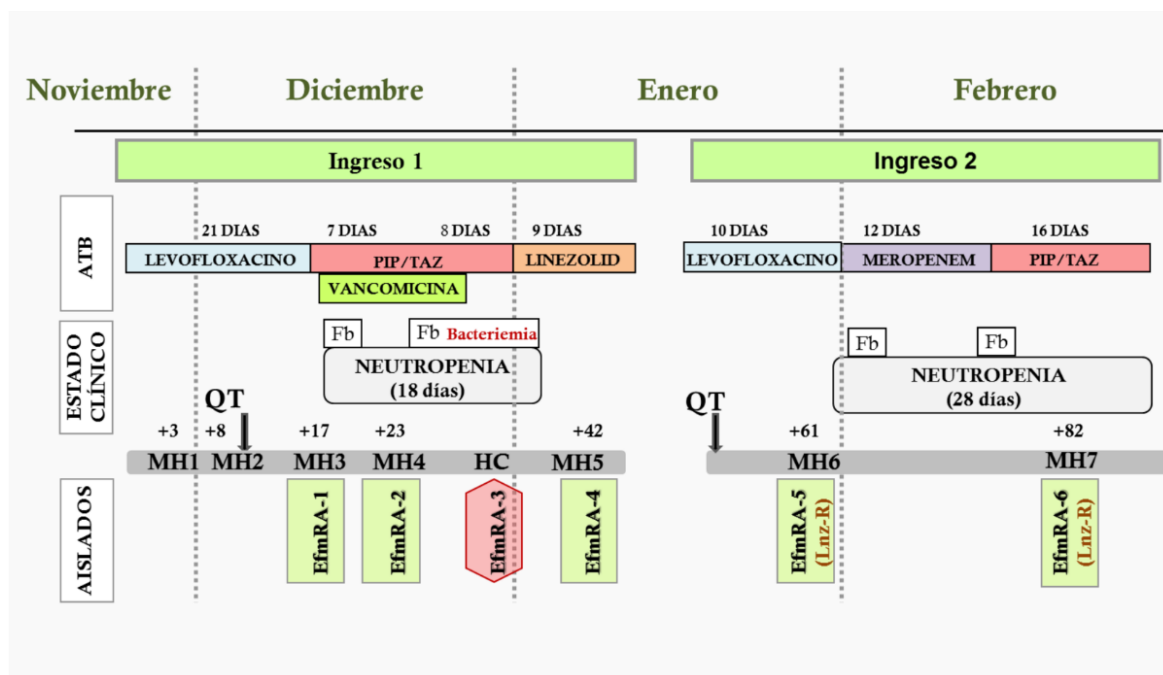
El paciente accedió a participar en el estudio, firmó el Consentimiento Informado y se obtuvieron muestras de heces para la detección de colonización por EfmRA, siguiendo el esquema descrito en el apartado Material y Métodos de este capítulo. En el día +18 del ingreso se detectó el primer aislado de EfmRA a nivel intestinal y cuatro días más tarde (día +22), el paciente desarrolló neutropenia febril (leucocitos: 1.300/ml, neutrófilos: 300/ml). En este momento se extrajeron hemocultivos, se interrumpió la PEL y se inició antibioterapia empírica con piperacilina-tazobactam (4.000 mg/8 h i.v.) y vancomicina (1.000 mg/12 h i.v.). En el día +25 se informó del aislamiento de *Staphylococcus epidermidis* en un hemocultivo y 5 días después (día +30) durante los cuales el paciente permaneció afebril, decidió retirarse la vancomicina y mantener tratamiento empírico con piperacilina-tazobactam. En el día +33 del ingreso (día +13 de neutropenia) el paciente volvió a presentar fiebre, por lo que se le extrajeron de nuevo hemocultivos. Dos días después se informó del crecimiento de EfmRA en estos hemocultivos, motivo por el que decidió cambiarse el tratamiento con piperacilina-tazobactam por linezolid (600 mg/12 h i.v.) durante 9 días hasta que fue dado de alta (día +44) (figura 16).

Una semana después del alta (día +51), el paciente ingresó de nuevo en el Servicio de Hematología para recibir un ciclo de reinducción de quimioterapia de 7 días con citarabina-idarubicina. En el día +61 se obtuvo una muestra de heces (MH6) en la que se aisló EfmRA resistente a linezolid. Este mismo día, el paciente desarrolló neutropenia febril por lo que se pautó meropenem (1.000 mg/8 h i.v) que se mantuvo hasta que el paciente volvió a presentar fiebre 12 días después (+73). En este momento se cambió el tratamiento con meropenem por piperacilina-tazobactam (4.000 mg/8 i.v.) que se mantuvo hasta el alta. En el día +82 y 41 días después de la finalización el tratamiento con linezolid, se recuperó un nuevo aislado de EfmRA resistente a linezolid en una muestra de colonización intestinal (MH7).

### 7.2. Caracterización molecular de los aislados de EfmRA

Durante los dos ingresos del paciente se aisló EfmRA en 5 de las 7 muestras de heces recogidas (figura 16). El primer aislado de EfmRA se detectó en el día +17 del primer ingreso (MH3) y el paciente se mantuvo colonizado por EfmRA hasta el alta (día +44). Durante el reingreso el paciente permaneció colonizado por EfmRA, pero en esta ocasión los aislados fueron resistentes a linezolid. Todos los aislados de EfmRA, tanto los de colonización como el aislado de bacteriemia, pertenecieron al mismo clon (EfmRA-ST117-BAPS 2.1a) (figura 17) y presentaron resistencia de alto nivel a la estreptomicina (>1.000 mg/L) y a la gentamicina (>500 mg/L), además de resistencia a levofloxacino y eritromicina. Los aislados EfmRA-6 y EfmRA-7 fueron además resistentes a linezolid (32 mg/L y 24 mg/L respectivamente). Todos los aislados fueron sensibles a vancomicina, teicoplanina y daptomicina.



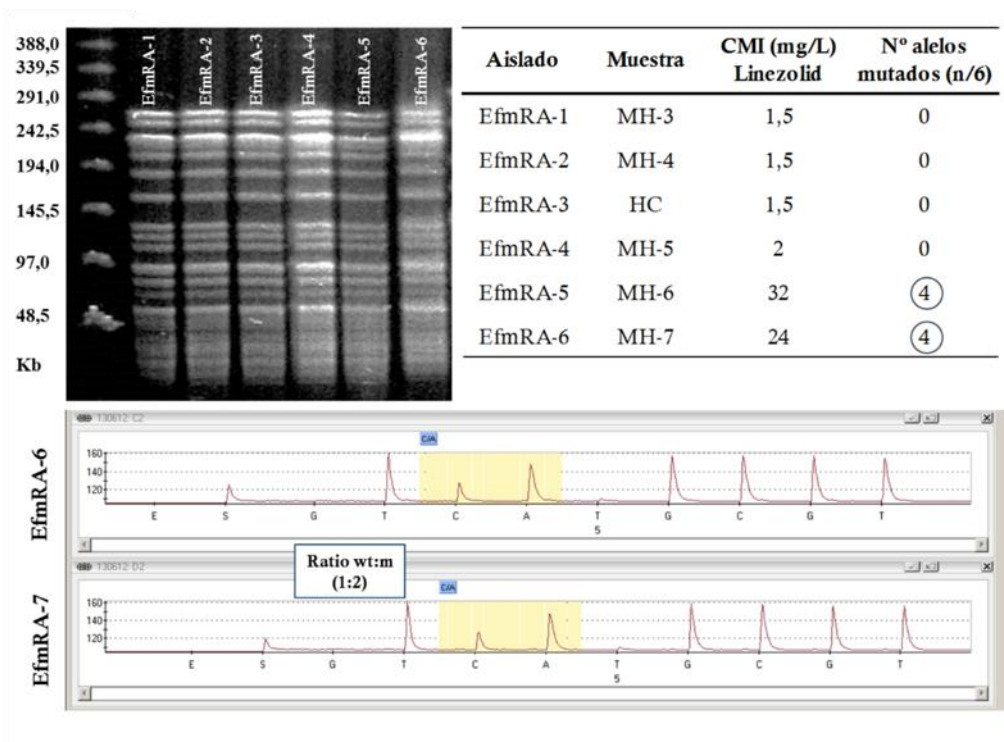


**Figura 16.** Cronograma de los acontecimientos producidos durante los ingresos del paciente en el que se detectó resistencia a linezolid en aislados de colonización de EfmRA, estado clínico, antibióticos administrados (ATB) y muestras recogidas durante ambos ingresos (muestras de heces, MH y hemocultivos, HC). Los números sobre la línea cronológica indican los días en que se tomaron esas muestras desde el primer ingreso. Abreviaturas: ATB, antibióticos; PIP-TAZ, piperacilina-tazobactam; Fb, fiebre; QT, quimioterapia; MH, muestra de heces; HC, hemocultivo.

### 7.3. Caracterización molecular de la resistencia a linezolid

La secuenciación de un fragmento de 9 nt del gen 23S rADN de todos los aislados EfmRA reveló la presencia de dos subpoblaciones a nivel de la posición 2576 (numeración *E. coli*) en los aislados EfmRA-6 y EfmRA-7. Una tenía T y otra, G, y esta última subpoblación no se encontró en los aislados sensibles a linezolid (EfmRA-3, EfmRA-4, EfmRA-5). La pirosecuenciación permitió confirmar los resultados obtenidos mediante la secuenciación Sanger y que los aislados resistentes tenían G y T en la posición 2576 en una proporción 1:2. Esto indicaría la presencia del polimorfismo T2576 en 4 de los 6 alelos que *E. faecium* tiene del gen 23S rADN.

No se detectó la presencia del gen *cfr* en ninguno de los aislados de EfmRA de este paciente.



**Figura 17.** Patrones de PFGE-*Sma*-I, CMIs a linezolid y número de alelos mutados (23S rADN) de los aislados de EfmRA con resistencia a linezolid. En la parte inferior se muestra el pirograma de los aislados EfmRA-6 y EfmRA-7 (secuencia complementaria). En amarillo aparecen señalados los dos picos correspondientes a los nucleótidos de la posición 2576.

## 8. Estudio por qPCR de los cambios en la microbiota intestinal de pacientes oncohematológicos

Se seleccionó un subgrupo de 20 pacientes oncohematológicos del estudio de colonización en base a su estado de colonizado (n=9; 6/9 con LMA y 3/9 con LLA) o no colonizado por EfmRA (n= 11; 7/11 con LMA, 2/11 con LLA, 1/11 con Mielofibrosis y 1/11 con LLC) para estudiar la evolución cualitativa y cuantitativa de la microbiota intestinal en diferentes momentos del ingreso (Basal, PEL, Pos-PEL). Los pacientes incluidos en el grupo de colonizados por EfmRA permanecieron ingresados durante 48 (rango 23-134 días) y recibieron PEL durante una mediana de 20 (rango, 8-40) días. Sin embargo, los pacientes incluidos en el grupo de no colonizados tuvieron ingresos más cortos (mediana: 31,1 días; rango, 19-39 días) y paralelamente recibieron PEL durante un menor número de días [mediana: 10 días; rango: 2-28 días).

### 8.1. Optimización y validación de las qPCR

De manera previa al estudio de los cambios cuantitativos en la microbiota de este subgrupo de pacientes, se adecuaron las concentraciones finales de cebadores y sonda para cada una de las PCRs de las 3 dianas bacterianas para asegurar una adecuada sensibilidad. Las combinaciones de cebador y sonda que permitieron detectar un mayor incremento en la intensidad de

fluorescencia, con un menor Ct (siempre  $Ct < 30$ ) y empleando la menor concentración de sonda se detallan en la tabla 12.

Una vez seleccionadas las concentraciones de trabajo se generaron tres curvas patrón a partir de diluciones seriadas de una muestra de ADN purificado de *E. faecium* (39,2 ng/ $\mu$ l-0,0392 ng/ $\mu$ l). La transformación de la curva de amplificación en una representación semilogarítmica ( $Ct$  vs log Dilución ADN) permitió el cálculo de la eficiencia (E) y coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de cada una de las reacciones (tabla 12).

**Tabla 12.** Concentraciones optimizadas de cebadores y sonda para las qPCR (16 S rADN, 23S rADN, *ddl*) y valores de eficiencia.

PCR	Concentración de cebadores (nM)	Concentración de sonda (nM)	Eficiencia (%)	Pendiente	Coefficiente de correlación
16S rADN	300	100	105	-3,20	0,998
23S rADN	300	150	110	-3,10	0,998
<i>ddl</i>	300	150	107	-3,15	0,990

En los tres casos, los valores de eficiencia y coeficiente de correlación se encontraron dentro de los límites aceptados como adecuados para establecer una correlación entre la concentración del ADN y el Ct ( $R^2 > 0,985$  y E: 80-110%).

## 8.2. Cambios en la microbiota de pacientes oncohematológicos

En la mayoría de los pacientes incluidos en este sub-estudio se observó una disminución de la carga bacteriana total en las muestras de PEL y Pos-PEL [reducción de un 1,01 (intervalo: -0,15 a -2,33) log en 85% de las muestras tomadas durante la PEL y 1,33 (intervalo: -0,05 a -3,16) log en 75% de las correspondientes con las fase de Pos-PEL] (Figura 18-heatmap).

Cuando se analizó la carga bacteriana del género *Enterococcus* en el grupo de pacientes colonizados por EfmRA se observó un aumento relativo respecto a las muestras basales de 1,79 (intervalo: 0,51-2,83) log en 77,7% de las muestras de PEL y de 2,23 (0,5-3,92) log en todas las muestras de la fase de pos-PEL. Este enriquecimiento en enterococos se observó de manera concomitante con el incremento significativo de *E. faecium* en las heces de estos pacientes durante la profilaxis extendida con levofloxacino [88,8% de las muestras; 1,38 (0,67-2,81) log] y en la fase de pos-profilaxis [100% de las muestras; 1,65 (0,47-3) log].

Por el contrario, en los pacientes del grupo no colonizados por EfmRA (de acuerdo a los resultados del cultivo), se detectó una caída de 2,42 (-0,66 a -3,95) log en la cantidad relativa de ADN de *E. faecium* en 82% de las muestras de la PEL. Además, en un 63,6% de las muestras de Pos-PEL, la cantidad relativa de ADN de *E. faecium* fue inferior a la detectada en las muestras basales. En tres de los pacientes en los que no se detectó colonización por EfmRA mediante cultivo (p27, p31 y p42), se observó un incremento en *E. faecium* en las muestras de Pos-PEL (0,9 log; 1,15 log y 3,65 log respectivamente).



Pacientes		Bacterias totales		<i>E. faecium</i>		<i>Enterococcus spp.</i>		Enfermedad	Duración del ingreso (días)	Duración PEL (días)
		PEL	Pos-PEL	PEL	Pos-PEL	PEL	Pos-PEL			
no colonizados por EfmRA	P 5	-2,01	-2,36	-0,66	-0,51	0,26	-0,59	LMA	39	7
	P 7	-2,33	-1,94	-3,75	-2,88	-3,40	-1,60	LMA	33	8
	P 21	-0,59	-0,71	0,26	-0,10	0,76	0,27	LMA	36	14
	P 27	0,73	-0,68	0,84	0,90	0,93	1,06	LMA	38	10
	P 29	-1,51	-2,10	-2,42	0,15	-3,55	-2,13	LMA	26	9
	P 31	-0,22	0,38	-0,81	1,15	-0,04	-0,61	LMA	36	26
	P 40	-0,93	0,14	-2,16	-0,63	0,53	-0,63	Mielof	30	28
	P 42	-0,15	-0,19	-1,37	3,65	1,05	3,01	LMA	32	2
	P 44	-1,43	-1,68	-3,06	-2,18	-3,69	0,46	LMC	33	16
	P 45	-1,45	-1,33	-3,95	-2,92	-3,74	-3,14	LLA	19	11
	P 49	0,10	-1,07	-2,57	-1,26	-0,73	-3,33	LLA	21	10
	Mdn	-0,93	-1,07	-2,16	-0,51	-0,04	-0,61		33	10
colonizados por EfmRA	P 2	-0,39	0,51	1,84	1,89	1,20	2,34	LMA	58	17
	P 3	-0,86	-1,87	2,11	2,51	1,56	1,50	LMA	98	40
	P 8	-0,60	0,77	-0,29	2,43	1,83	1,65	LLA	96	10
	P 12	1,29	1,71	1,55	3,92	1,23	2,15	LLA	134	31
	P 13	-1,43	-1,24	0,51	2,23	0,37	2,08	LLA	48	27
	P 19	-1,01	-3,16	1,79	0,70	1,53	0,47	LMA	47	20
	P 25	-1,44	-1,93	1,08	0,52	0,67	1,26	LMA	23	8
	P 33	-0,42	-0,05	-0,23	1,69	-0,10	1,34	LMA	43	14
	P 47	-1,47	-0,67	2,83	3,06	2,81	3,00	LMA	32	21
	Mdn	-0,86	-0,67	1,55	2,23	1,23	1,65		48	20



**Figura 18.** Abundancia relativa de *E. faecium*, *Enterococcus spp.* y bacterias totales en muestras de heces de pacientes colonizados y no colonizados por EfmRA durante la profilaxis extendida con levofloxacino (PEL) y pos-profilaxis (Pos-PEL) con respecto a las muestras basales cuantificada mediante qPCR. Las celdas en rojo indican una disminución logarítmica de la cantidad de ADN por debajo del nivel basal en tanto que las verdes representan un incremento con respecto a ésta. Abreviaturas: P, paciente; Mdn, mediana; LMA, leucemia mieloide aguda; LLA, leucemia linfocítica aguda; Mielof, mielofibrosis.





“Si no tienes éxito a la primera, inténtalo al menos dos veces más, de manera que al menos el fallo sea estadísticamente significativo”

Anónimo

## CAPÍTULO II

---

**Características Diferenciales de la Interacción de *E. faecium* y *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* con la Célula Hospedadora y su Posible Papel en el Desarrollo de Infección**



## ANTECEDENTES

### 1. *Streptococcus* del grupo D

*Enterococcus faecium* y *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. gallolyticus*) son dos especies de bacterias grampositivas que colonizan el TGI del hombre y de diversos animales. Ambas tienen un bajo contenido en G+C, crecen en presencia de bilis e hidrolizan la esculina [13]. Desde comienzos del pasado siglo y durante más de 50 años, las bacterias de los actuales géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* grupo bovis (*S. bovis*), se agruparon juntas en el grupo D de la clasificación de los estreptococos propuesta por Rebecca Lancefield. Esta clasificación se basa en las reacciones serológicas de los carbohidratos de la pared celular que, en el caso del grupo D se trata de un ácido glicerol-teicoico (polímero del glicerol y ribitol) [213].

#### 1.1. Taxonomía

En 1984 las especies conocidas hasta entonces como *Streptococcus faecium* y *Streptococcus faecalis*, en base a los resultados obtenidos en estudios de hibridación ADN-ADN y secuenciación del gen 16S rADN, se transfirieron a un nuevo género: *Enterococcus* [15]. Por el contrario, la taxonomía *S. bovis* ha evolucionado de manera progresiva con la descripción de nuevas especies pertenecientes a este grupo.

De manera clásica los aislados humanos de *S. bovis* se han clasificado en función de sus características fenotípicas, distinguiéndose dos biotipos: biotipo I (fermentadores de manitol), y el biotipo II (no fermentadores de manitol). Sin embargo, durante la última década, el empleo de la secuenciación del gen 16S rARN y el gen *sodA* ha conducido a que este grupo sufra una importante reclasificación que tiene, además, implicaciones clínicas [214] (tabla 13). En la actualidad, las antiguas especies de *S. bovis* se agrupan dentro del complejo *Streptococcus bovis/equinus*, que incluye tanto especies aisladas de humanos (*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. gallolyticus*) o *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*) como animales (*Streptococcus equinus*, *Streptococcus alactolyticus*). De todas estas especies, *S. gallolyticus* destaca por su importante papel en cuadros clínicos de endocarditis y su asociación con el cáncer colorrectal [215,216].

A pesar de estos cambios taxonómicos las especies de ambos géneros comparten rutas metabólicas, nicho ecológico y tienen un contenido genético similar [217].

**Tabla 13.** Nomenclatura de las principales especies humanas del complejo *Streptococcus bovis/ equinus*.

Antiguo nombre	Nuevo nombre	Sinónimos
<i>Streptococcus bovis</i> biotipo I	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i>
<i>Streptococcus bovis</i> biotipo II/1	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	<i>Streptococcus infantarius</i>
<i>Streptococcus bovis</i> biotipo II/1	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>coli</i>	<i>Streptococcus lutetiensis</i>
<i>Streptococcus bovis</i> biotipo II/2	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	<i>Streptococcus pasteurianus</i>
<i>Streptococcus macedonicus</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	--

## 1.2. Importancia clínica

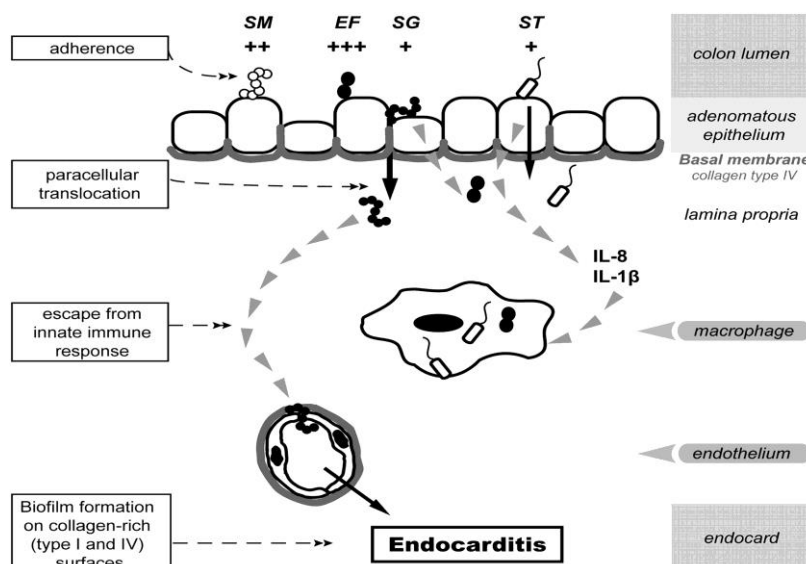
### 1.2.1. Complejo *Streptococcus bovis/equinus*: papel de *S. gallolyticus*

Las especies de este complejo colonizan de manera variable el TGI de humanos (5%-23,8%) [34] y están implicados en cuadros clínicos de bacteriemia asociada o no a endocarditis [218] principalmente en varones de avanzada edad [219]. De hecho, desde 1951 se conoce la asociación entre un cuadro clínico de bacteriemia/endocarditis y la existencia oculta de cáncer colorrectal [220]. En el ser humano la principal vía de infección es el propio TGI aunque se han descrito otros como la orofaringe, el tracto urinario o el árbol biliar [221].

La endocarditis infecciosa es una enfermedad relativamente poco frecuente, pero con una muy alta morbi-mortalidad asociada. La incidencia anual oscila de 3 a 10 casos por cada 100.000 habitantes, aunque depende de las series y países [222–224]. Se han descrito diversos factores de riesgo que predisponen a padecerla como son las cardiopatías congénitas, los portadores de prótesis valvulares o los consumidores de drogas por vía parenteral [225].

La endocarditis por *S. bovis* es una infección con una incidencia variable pero generalmente inferior al 10% [144,225]. Sin embargo, se han encontrado porcentajes superiores, de hasta el 25-50% en pacientes con bacteriemia y también en el sur de Francia [226–228].

La bacteriemia/endocarditis por *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (antiguo biotipo I), presenta una asociación significativa con la existencia de lesiones malignas y premalignas en el colon. Por ello, numerosos protocolos incluyen la exploración colonoscópica en el estudio de la endocarditis infecciosa para descartar la presencia oculta de cáncer colorrectal [229]. Sin embargo, todavía en la actualidad y pese a haberse presentado distintos modelos de infección, se desconoce si el propio cáncer colorrectal predispone a la bacteriemia por este microorganismo o si por el contrario *S. gallolyticus* desempeña un papel en el desarrollo del mismo.



**Figura 19.** Modelo de infección de *S. gallolyticus* propuesto por Boleij y cols. en 2011.

En este sentido Boleij y cols. propusieron en 2011 un modelo que trata de explicar la asociación entre *S. gallolyticus*, la endocarditis y el cáncer colorrectal. Este grupo, basados en sus resultados, afirma que tienen lugar cuatro acontecimientos clave en el desarrollo de la endocarditis infecciosa desde el TGI: 1) establecimiento de una conexión con el enterocito o la matriz extracelular, 2) translocación de la barrera epitelial, 3) evasión del sistema inmune en la lámina propia y 4) supervivencia en el torrente circulatorio y capacidad de producir una infección secundaria (figura 19) [230].

### 1.2.2. *Enterococcus faecium*

Como ya se avanzó en la introducción general de esta tesis, *E. faecium* es capaz de producir infecciones de muy diversa naturaleza, pero destaca por su importancia y gravedad la bacteriemia. En los últimos años se ha comunicado un aumento del número de bacteriemias enterocócicas asociadas al ambiente hospitalario. Este aumento parece estar relacionado con un aumento de las bacteriemias producidas por *E. faecium*, particularmente por cepas con resistencia a la ampicilina. El porcentaje de cepas de *E. faecium* resistentes a la ampicilina tanto en nuestro hospital como en otros de tercer nivel es cercano al 90 % [141,195,199,231]. En un estudio reciente realizado en Dinamarca estimaron la incidencia de bacteriemia por *E. faecium* en 6,6 casos por cada 100.000 habitantes y el 85, 2% de ellas tuvieron un origen nosocomial [142].

La mayoría de las bacteriemias por *E. faecium* resistente a la ampicilina tienen lugar en pacientes inmunocomprometidos y se han encontrado como factores de riesgo la presencia de cánceres hematológicos, terapia inmunosupresora, uso previo de antibióticos (principalmente cefalosporinas) y mucositis asociada a neutropenia febril [141].

*E. faecium*, a diferencia de *E. faecalis* y *S. gallolyticus*, es una causa muy poco frecuente de endocarditis y su implicación en este cuadro suele considerarse una complicación de la bacteriemia [145].

Aunque varios trabajos han puesto de manifiesto un sobrecrecimiento de *E. faecium* en pacientes colonizados que parece incrementar el riesgo de bacteriemia [232], no existen hasta la fecha trabajos que hayan profundizado en la capacidad intrínseca de este microorganismo para acceder al torrente circulatorio desde su localización intestinal.

## 2. El epitelio intestinal humano

### 2.1. Estructura

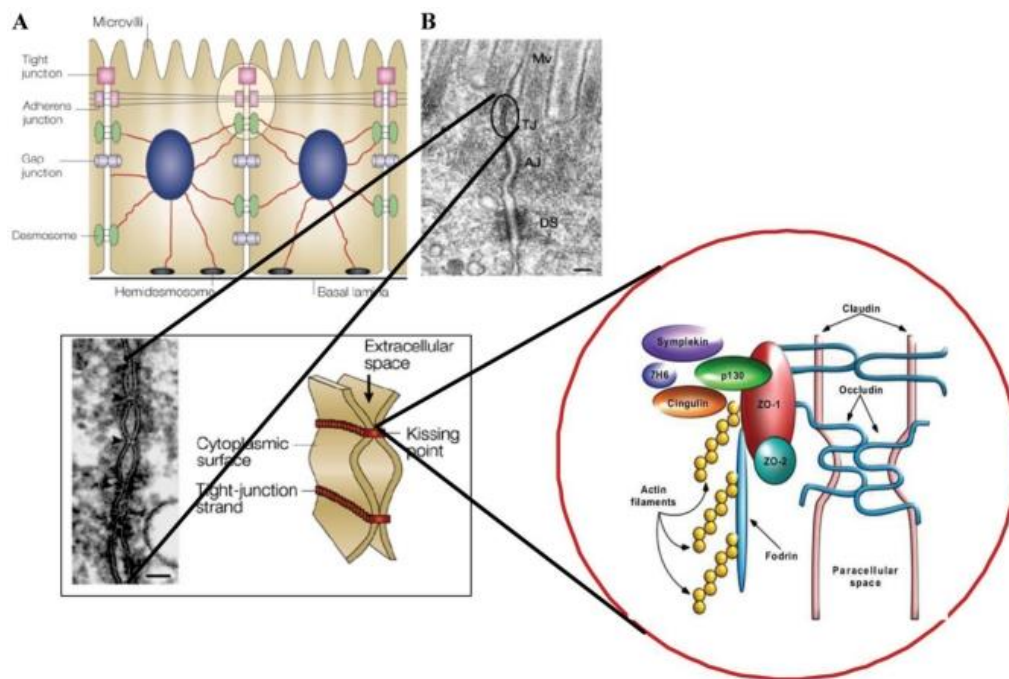
El epitelio intestinal humano es un epitelio simple de células polarizadas que desempeña un papel muy importante en la resistencia frente a la infección. Cada una de las células que conforman el epitelio tiene una superficie apical, expuesta al medio ambiente externo y una superficie basolateral, de cara al interior del hospedador [233].

Las células epiteliales se unen unas a otras mediante complejos especializados denominados uniones estrechas, formadas por varias proteínas transmembrana (como la ocludina o la claudina) y por proteínas intracelulares (como ZO-1 o ZO-2). Su principal función es sellar el espacio intercelular entre células adyacentes creando una barrera primaria que impide la circulación de fluidos, electrolitos o macromoléculas vía paracelular.



Efectivamente, las uniones estrechas son esenciales para una correcta función de barrera así como para el mantenimiento de la polaridad del epitelio intestinal.

El ensamblaje-desensamblaje de las uniones estrechas entre células está controlado, en parte, por su unión a proteínas del citoesqueleto y también a la E-cadherina (uniones adherentes) [234]. Las uniones adherentes se localizan en los laterales de la membrana, justo por debajo de las uniones estrechas. La E-cadherina es una proteína transmembrana que media la agregación homotípica dependiente de calcio entre células adyacentes. Esta proteína interacciona mediante sus dominios citoplasmáticos con las proteínas intracelulares denominadas cateninas (figura 20). La adherencia de las células epiteliales a la membrana basal tiene lugar mediante proteínas de la familia de las integrinas y es igualmente importante para el desarrollo de la estructura epitelial y su función [234].



**Figura 20.** Estructura molecular de las uniones estrechas en las células epiteliales intestinales.

La barrera epitelial es la primera línea de defensa frente a la entrada de la mayoría de patógenos, por lo que el mantenimiento de su integridad es crucial como defensa frente a la infección. Su correcto funcionamiento va a depender principalmente de la microbiota (barrera ecológica), del epitelio mucoso (barrera mecánica) y de la secreción de IgA y de las células inflamatorias (función de barrera) [233].

## 2.1. Translocación

La translocación se define como el paso de bacterias o sus productos a través de la membrana gastrointestinal. Este proceso ocurre de manera natural en individuos sanos y probablemente la translocación de endotoxinas de bacterias viables o muertas en pequeñas cantidades constituya un proceso fisiológico importante en la estimulación del sistema reticuloendotelial. Sin embargo, este proceso puede verse favorecido por estados patológicos como la pancreatitis,

un trauma, cirugía o el empleo de fármacos citotóxicos que produzcan un incremento de la permeabilidad de la barrera [233].

Existen dos vías principales por las que puede tener lugar la translocación bacteriana: transcelular, a través de los enterocitos y paracelular, mediante su interacción con las uniones estrechas.

La bacteriemia por *E. faecium* y *S. gallolyticus* suele ser la consecuencia final de un proceso endógeno de translocación intestinal. En el cáncer colorectal y en los pacientes oncohematológicos con tratamiento inmunosupresor, la integridad de la barrera intestinal se ve alterada y como consecuencia se observan frecuentemente alteraciones de la permeabilidad y daño de la capa mucosa del epitelio.

### 2.1.2. Modelos de estudio de translocación bacteriana *in vitro*: células Caco-2

Se han utilizado varios métodos para el estudio de la translocación bacteriana que pueden ser directos o indirectos. La identificación de bacterias intestinales en los ganglios mesentéricos en un modelo animal, se considera una evidencia directa. Como métodos indirectos destaca el empleo de líneas celulares intestinales como Caco-2 o T-84 [230,235].

Las células Caco-2 son una línea celular continua de células derivadas de adenocarcinoma colorectal epitelial humanas, desarrolladas por el Instituto de Cáncer Sloan-Kettering de EE.UU. Aunque tienen un origen canceroso tienen también una capacidad única para iniciar su diferenciación espontánea una vez que alcanzan la confluencia en condiciones normales de cultivo (presencia de glucosa y suero). De manera secuencial, durante un periodo de 15-20 días, estas células desarrollan una polaridad morfológica y niveles de hidrolasas en los bordes en cepillo comparables con los de células intestinales maduras. Por este motivo este modelo celular ha sido frecuentemente empleado no sólo en el estudio de la adhesión y translocación bacteriana, sino en el estudio de las vías de transporte de fármacos a través de la membrana [236].

## 3. Importancia de la adhesión y formación de biopelículas

La adhesión a distintos sustratos y la capacidad de crecer en biopelículas, son dos de los factores importantes en la colonización/ virulencia tanto de *E. faecium* y *S. gallolyticus* y su papel parece fundamental en el desarrollo de infección. En ambas especies existen numerosos compuestos de la membrana celular, como las denominadas MSCRAMMs, proteínas de adhesión a colágeno o proteínas del pili que parecen desempeñar un papel crucial en la adhesión tanto al epitelio mucoso como a distintos tipos de colágeno [230,237,238].

La formación de biopelículas sobre distintas superficies y su relación con la patogenia se ha comunicado menos frecuentemente en los aislados de *E. faecium* que en los de *E. faecalis*. Además y pese a que inicialmente se relacionó la presencia del factor Esp<sub>Efm</sub> con la formación de biopelículas [38], existen comunicaciones contradictorias acerca de su contribución a la formación de las mismas [239,240].



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

*E. faecium* y *S. gallolyticus* no solo comparten su nicho ecológico en el TGI del hombre si no que se ven involucrados en procesos infecciosos muy graves como la endocarditis y la bacteriemia que adquieren una especial relevancia en pacientes con algún tipo de inmunosupresión. Pese a esta similitud y la sugerencia de que la principal fuente de infección sea endógena, por translocación a través del epitelio intestinal, su implicación en estos procesos difiere sustancialmente. Estas diferencias podrían deberse, en parte, no sólo a la distinta expresión de factores asociados a virulencia, sino a su mayor o menor capacidad de colonizar e invadir el epitelio mucoso intestinal, así como a diferencias intrínsecas en su capacidad para translocar.

Por lo expuesto previamente, se hace patente la importancia de conocer las características de la interacción (adhesión y formación de biopelículas) de *E. faecium* y *S. gallolyticus* con la célula epitelial intestinal y su capacidad para translocar a través de la misma.

En consonancia, los objetivos propuestos para este capítulo fueron:

1. Estudiar la **capacidad de adhesión e invasión** de aislados de colonización, clínicos y animales de *E. faecium* y *S. gallolyticus* *in vitro* empleando un modelo celular.
2. Establecer si existen diferencias significativas en la **producción de biopelículas** sobre distintos soportes inertes
3. Comparar la **capacidad de translocación** *in vitro* de aislados de colonización, clínicos y animales de *E. faecium* y *S. gallolyticus*.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Selección de aislados bacterianos y condiciones de cultivo

Para llevar a cabo los distintos ensayos descritos en este capítulo se seleccionaron 6 aislados de *E. faecium* (4 de ellos procedentes del estudio de colonización en pacientes hematológicos desarrollado en el Capítulo I y otros 2 adicionales, aislados de colonización de personas sanas [166]) y 4 aislados de *Streptococcus gallolyticus*. Las cepas de referencia *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)) y *Lactobacillus reuteri* (Colección española de cultivos tipo, CECT 925 T) se emplearon como controles de los distintos experimentos. La procedencia y principales características de los aislados (perfil de resistencia antibiótica, genes asociados a virulencia) se detallan en la tabla 14.

Todos los aislados se cultivaron inicialmente en agar Columbia con sangre de caballo al 5% (Becton, Dickinson), con la excepción de *L. reuteri*, para el que se empleó el medio Man-Rogosa-sharpe (MRS, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) suplementado con L-cisteína (0,5 g/L). Las placas se incubaron a 37°C 18-24 h o 48 h, en el caso de *L. reuteri*.

Los inóculos empleados para los ensayos de adhesión, invasión y translocación de este capítulo se prepararon de la siguiente manera: Se suspendieron 2-3 colonias de cada aislado en 20 ml de BHI o medio MRS y se incubaron *o.n.* a 37°C sin agitación. Al día siguiente se centrifugaron los cultivos a 3000 r.p.m. durante 10 min y se suspendieron los pellets en 2 ml de solución salina estéril al 0,9%. Se ajustó la densidad óptica (DO<sub>600</sub>) a 1 y se diluyó la cantidad necesaria en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) para obtener una concentración final de 5x10<sup>7</sup> UFC/ml. Esta fue la suspensión empleada como inóculo para estos ensayos.

**Tabla 14.** Características de los aislados empleados en este capítulo.

Especie	Aislado	Origen	Muestra	míst (ST)	Perfil de resistencia ATB	Genes de virulencia	Referencia
<i>E. faecium</i>	Efm106	paciente OH	Heces	18	Amp, Ran-St, E	<i>esp, hyl, acm</i>	Sánchez-Díaz y cols., 2015
<i>E. faecium</i>	Efm113	paciente OH	Heces	117	Amp, Levo, Ran-St, Ran-G, E	<i>esp, hyl, acm</i>	Sánchez-Díaz y cols., 2015
<i>E. faecium</i>	Efm121	paciente OH	Sangre	117	Amp, Levo, Ran-St, E	<i>esp, acm</i>	Sánchez-Díaz y cols., 2015
<i>E. faecium</i>	Efm197	paciente OH	Heces	117	Amp, Levo, Ran-St, Ran-G, E, Lnz	<i>esp, hyl, acm</i>	Sánchez-Díaz y cols., 2015
<i>E. faecium</i>	Efm217	paciente ext	Heces	25	Amp, Levo, Ran-St, Kan, Tet	<i>acm</i>	Tedim y cols., 2015
<i>E. faecium</i>	Efm222	paciente ext	Heces	699	--	--	Tedim y cols., 2015
<i>S. gallolyticus</i>	Sg1	paciente	Sangre	34	Min	<i>pil1</i>	Romero y cols., 2015
<i>S. gallolyticus</i>	Sg6	paciente	Sangre	35	Clin, Fos	<i>pil1</i>	Romero y cols., 2015
<i>S. gallolyticus</i>	Sg74	Vaca	Heces	24	Ran-St, E, Min, Clin, Sxt	<i>pil1</i>	Romero y cols., 2015
<i>S. gallolyticus</i>	Sg78	Ternero	Heces	28	Clin, Sxt, Van, Q/D	--	Romero y cols., 2015
<i>E. faecalis</i>	Efc29212	ATCC	--	30	--	--	<a href="http://www.atcc.org">www.atcc.org</a>
<i>L. reuteri</i>	Lr925	CECT 925T	--	--	--	--	<a href="http://www.cect.org">www.cect.org</a>

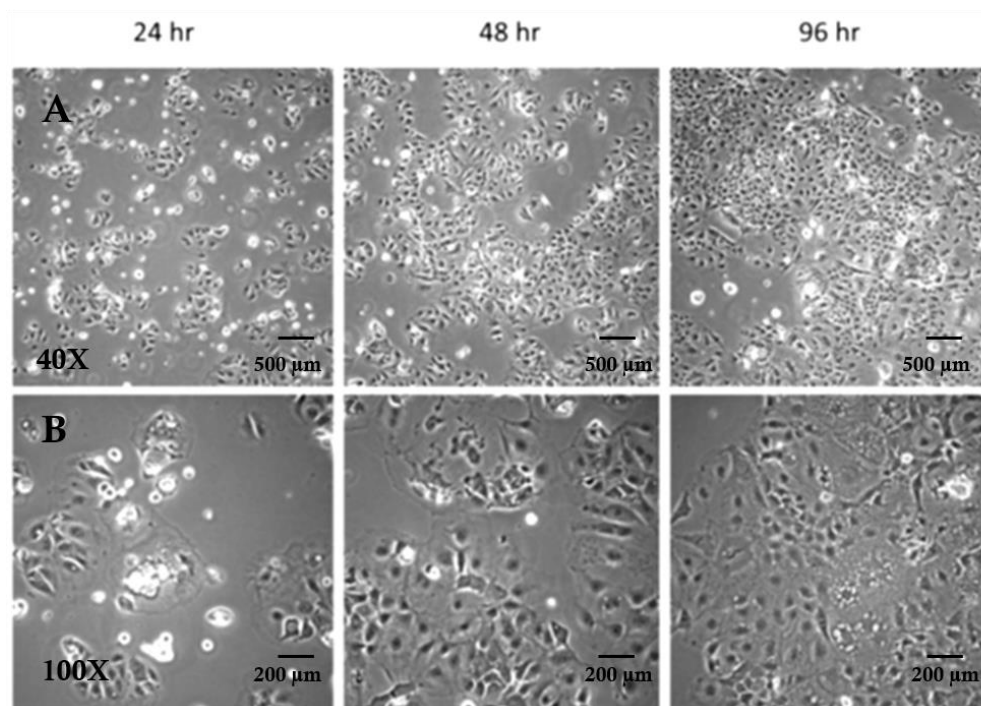
### 2. Línea celular: células Caco-2

Para examinar las características de adhesividad, invasividad y translocación bacteriana se seleccionó la línea celular Caco-2 (ATCC HTB37). La descongelación, mantenimiento, propagación y siembra para los distintos ensayos se realizó de la siguiente manera:

## 2.1. Descongelación y propagación

1. Se extrajo un vial de células ( $1 \times 10^6$  células/ml) de la fase de vapor del congelador de nitrógeno líquido (ATCC®-HTB37™) y se descongeló durante 2-3 min en un baño de agua estéril con agitación a 35-37°C. A partir de este momento, toda la manipulación de las células se llevó a cabo en campana de flujo laminar BSL-2, Cellgard HD NU481 (NuAire, Reino Unido).
2. A continuación, se suspendió el contenido del vial en 20 ml de medio esencial DMEM completo (DMEM suplementado con: 10% suero bovino fetal, SBF; y penicilina G (100U/ml)-estreptomicina (100 mg/L)- 0,5% L-glutamina, Gibco BRL, NY, EE. UU.) en un tubo falcon estéril.
3. El contenido del falcon se centrifugó a 1.500 r.p.m. a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante (para eliminar los restos de dimetil sulfóxido, DMSO, empleado en la congelación de las células) y se suspendieron las células en 10 ml de medio DMEM completo.
4. Se usaron 500  $\mu$ l de la suspensión celular para hacer el conteo de células y verificar la viabilidad celular. La suspensión celular restante se inoculó en una placa petri para cultivo celular de 100 mm (Corning Inc, Thermo Fisher Scientific) sobre la que se anotó la densidad de siembra. Las células se incubaron a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  en una estufa con 5%  $\text{CO}_2$ .
5. Las células se incubaron a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  en una estufa con 5%  $\text{CO}_2$ .

Para controlar el crecimiento celular, los cultivos se inspeccionaron diariamente mediante un microscopio invertido (figura 21). De manera general, el medio de cultivo se renovó cada 48 h.



**Figura 21.** Microfotografía del estado de un cultivo de células Caco-2 en distintos momentos (24, 48 y 96 h) tras la siembra de  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

La propagación del cultivo se realizó cuando las células alcanzaron un 80-90% de confluencia. En ese momento se realizó el siguiente procedimiento:



1. Se retiró el medio de cultivo viejo mediante aspiración con pipetas de plástico estériles y se realizaron dos lavados con solución salina tamponada con fosfato atemperada (PBS, Gibco) para eliminar los restos de suero bovino fetal.
2. Se añadió a cada placa petri de 100 mm, 2 ml de tripsina-0,25% EDTA (Sigma-Aldrich) y se incubó 4-5 min a 37°C hasta que las células se disgregaron. El estado celular se controló con un microscopio invertido.
3. Para inactivar la tripsina se añadieron 4 ml de medio DMEM completo por placa y se homogenizó el contenido con una pipeta para asegurar la disgregación de las células. Se retiraron 500 µl de la suspensión celular para determinar la concentración de células mediante conteo en cámara de Neubauer.
4. Se tomó el volumen necesario de esta suspensión para asegurar una densidad de siembra de aproximadamente  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, y se transfirió a una nueva placa con DMEM completo atemperado para obtener un volumen final de 12 ml.

## 2.2. Siembra de Células Caco-2

### 2.2.1. Adhesión e invasión

Para realizar los ensayos de adhesión e invasión celular se sembraron placas de cultivo celular de 24 pocillos (15,6 mm de diámetro y 1,9 cm<sup>2</sup>, Corning Inc, Thermo Fisher Scientific) a una densidad de siembra de  $5,2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> (pases 3-15) con medio DMEM completo. Las células se mantuvieron en cultivo a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> durante una media de 10-14 días. El medio de cultivo se cambió cada 48-72 h.

### 2.2.2. Translocación

Para este ensayo se emplearon sistemas de dos compartimentos, uno apical y otro basolateral móvil, incluidos en placas de 24 pocillos (sistemas Transwell®: 6,5 mm de diámetro, 8 µm de tamaño de poro, Corning Inc, Thermo Fisher Scientific). Las células se sembraron a una densidad de  $3,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> sobre los insertos estériles (compartimento apical) con membranas de policarbonato y se añadió 500 µl de DMEM completo a los compartimentos basolaterales. Las células se mantuvieron en cultivo hasta que se formó una monocapa de células confluentes y diferenciadas (12-15 días). El medio de cultivo de ambos compartimentos se renovó con DMEM completo cada 48-72 h.

## 2.3. Inmunohistoquímica y microscopía confocal

Para controlar la formación de monocapas y el estado de diferenciación celular tras 10-14 días en cultivo, se llevaron a cabo varias tinciones inmunohistoquímicas. Para ello se sembraron, en paralelo a la siembra de los pocillos para los ensayos de adhesión e invasión,  $2 \times 10^5$  células Caco-2 sobre cubreobjetos de vidrio estériles. Las células se mantuvieron en cultivo durante 10-14 días en medio DMEM completo, que se renovó aproximadamente cada 48 h. Transcurridos esos días se fijaron las células con para-formaldehído al 4% y a continuación se permeabilizaron con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) 0,1% en PBS 1x durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente los cubres se lavaron varias veces con PBS 1x y se bloquearon con BSA 1% en PBS 1x durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el bloqueo y se incubaron los distintos cubres con los anticuerpos primarios E-cadherina (ratón, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EE.UU.), ZO-1 (conejo, BD Biosciences Franklin Lakes) y Paxilina (ratón, BD Biosciences Franklin Lakes) a una concentración 1:100 durante 1 h a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Tras tres lavados con PBS, se



incubaron las células con los anticuerpos secundarios apropiados: Alexa 488 (anti-conejo y anti-ratón, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.), Alexa 594 (anti-ratón, Molecular Probes), y faloidina-Alexa 568 (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) a una concentración 1:250 durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS, los cubres se montaron sobre portas utilizando 10 µl de Mowiol (Mw 4-88 Reagent. Sigma-Aldrich) y se observaron mediante un microscopio confocal (Leica TCS-SP5-AOBS-UV, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Se obtuvieron imágenes representativas y proyecciones ortogonales con el software del Leica Confocal (LCS Lite, Leica Microsystems).

### 3. Ensayos de adhesión

Para estudiar la capacidad de adhesión celular de los distintos aislados, las monocapas celulares se lavaron dos veces con 500 µl de PBS atemperado y se incubaron durante 1,5 h con 500 µl de medio DMEM-SBF 10% sin antibióticos. Transcurrido este tiempo se añadieron por triplicado los inóculos bacterianos, procedentes de un cultivo *o.n.* ( $10^6$ - $10^7$  UFC/ml, multiplicidad de infección, MOI de 10), se centrifugaron las placas 3 min a 250 r.p.m. y se incubaron 2 h a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Tras la incubación, se retiró el medio y se lavaron 3 veces las monocapas con 500 µl de PBS atemperado para retirar las bacterias no adheridas. A continuación, se incubaron 15 min con 200 µl de Tritón X-100/PBS al 0,1% y se hicieron diluciones seriadas en base diez del sobrenadante. Éstas se sembraron en placas de agar sangre y en placas selectivas m-Ent y se incubaron a 24-48 h a 37°C. Transcurrido el periodo de incubación, se contaron las UFCs crecidas en cada placa y se estimó el porcentaje de UFCs/ml adheridas respecto al inóculo inicial de cada aislado. Este ensayo se repitió por triplicado para cada uno de los aislados y en 2-3 ensayos independientes.

### 4. Ensayos de invasión celular

El estudio de la capacidad de invasión de los aislados se realizó añadiendo una fase adicional de incubación con dos antibióticos (al menos uno con capacidad bactericida) y posterior lisis celular. La capacidad bactericida de estas combinaciones en medio DMEM se comprobó previamente *in vitro* empleando inóculo de  $10^7$ UFC/ml de cada uno de los aislados.

Para ello, tras incubar las monocapas con los diferentes aislados y los lavados con PBS, se adicionó 500 µl de DMEM suplementado con 10 mg/L de vancomicina + 100 mg/L de lisozima a los pocillos con *E. faecium*, y 200 mg/L de estreptomycin + 50 mg/L de ampicilina, a aquellos que con *S. gallolyticus*. Las células se mantuvieron en incubación durante 2 h a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. A continuación, se realizaron 3 lavados con 500 µl PBS y posteriormente se lisaron las células con 200 µl de Tritón X-100/PBS al 1% durante 15 min y se realizaron diluciones seriadas en base diez que se sembraron en placas de agar sangre o m-Ent. Tras incubación 24- 48 h a 37°C se contó el número de colonias en cada placa y se estimaron las UFC/ml internalizadas. Los resultados se expresaron como el porcentaje de UFCs/ml con capacidad invasiva respecto al inóculo inicial. Este ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los aislados y en 2-3 ensayos independientes.

Los inóculos bacterianos empleados en el ensayo de adhesión-invasión se controlaron en cada experimento mediante la siembra de diluciones en placas de agar sangre y el posterior conteo de UFCs.

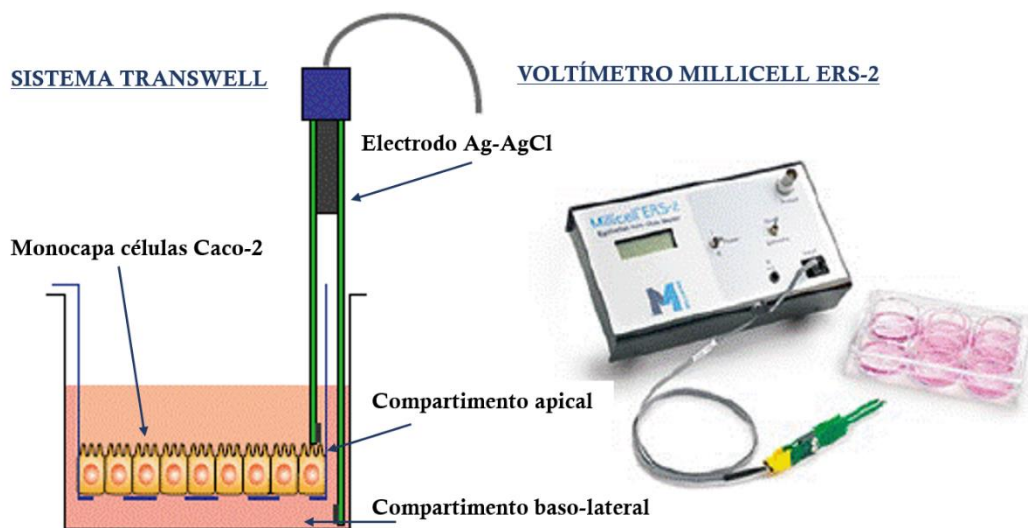
## 5. Estudio de translocación bacteriana

### 5.1. Medida de la resistencia transepitelial

La resistencia transepitelial de las monocapas (TER) es el resultado de la diferencia de potencial entre la cámara superior y la inferior y su valor refleja el grado de fortaleza de las uniones estrechas y, por tanto, de la permeabilidad de las membranas.

Para controlar el grado de confluencia y la integridad celular se midió la TER empleando el voltímetro Millicell ERS-2 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EE.UU.). Los electrodos se esterilizaron durante 15 min en una solución de etanol al 70% y se dejaron secar completamente al aire. Antes de realizar la primera medición se sumergió el electrodo en una solución de medio DMEM completo atemperado (figura 22).

Las medidas de TER de cada pocillo se registraron diariamente, a partir del día 4 pos-siembra, para controlar la evolución de la diferenciación celular y evitar realizar experimentos en aquellos pocillos en los que no se hubiera formado una monocapa de células.



**Figura 22.** Sistema de medida de la resistencia trans-epitelial (TER). Voltímetro empleado y su correcta disposición en el dispositivo transwell.

Para el cálculo de la TER efectiva ( $\Omega/\text{cm}^2$ ) se substrajo del valor de cada pocillo el obtenido de la medición de un blanco (inserto Transwell sin células) y se multiplicó por la superficie específica del pocillo:  $\Omega_e = (\Omega_x - \Omega_b)0,33$ .

## 5.2. Ensayo de translocación bacteriana

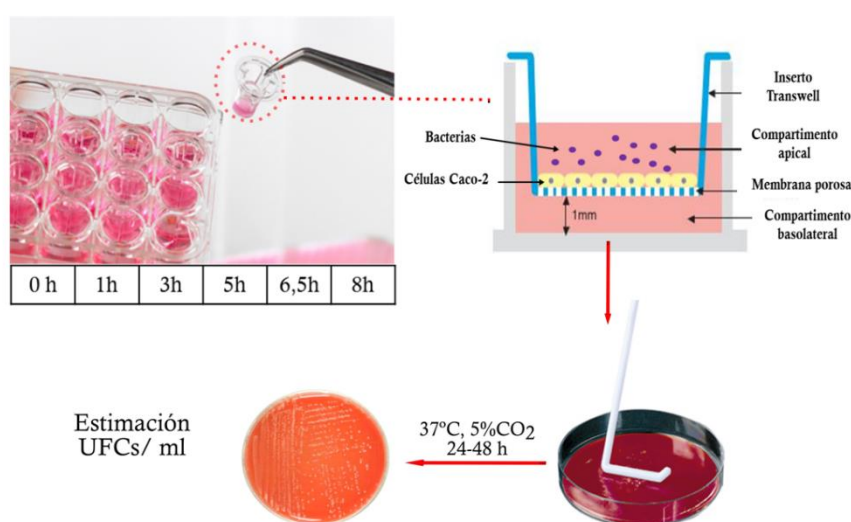
Los ensayos de translocación se llevaron a cabo cuando se alcanzaron valores de TER estables e indicativos de diferenciación celular ( $500\text{-}650\ \Omega/\text{cm}^2$ , 12-15 días). En ese momento se lavaron tres veces las monocapas con PBS atemperado y se incubaron al menos 2 h en medio DMEM-10% SBF sin antibiótico. A continuación, se añadieron los inóculos ( $10^7$  UFC/ml, MOI=10; ver apartado 1) a los compartimentos apicales, se midió el TER de cada pocillo y se tomó una alícuota (100  $\mu\text{l}$ ) del compartimento basolateral. Las placas se incubaron en a  $37^\circ\text{C}$  en estufa de 5%  $\text{CO}_2$  hasta el siguiente punto de muestreo. Se tomaron alícuotas del compartimento basolateral en los siguientes puntos: 1, 3, 5, 6,5 y 8 h.

En cada uno de los puntos de muestreo se registró la TER de cada pocillo individual y se tomaron alícuotas de los compartimentos basolaterales. A partir de estas alícuotas se realizaron diluciones en base diez ( $10^{-1}$ - $10^{-3}$ , dependiendo del punto de muestreo) y sembraron en placas de agar sangre/m-Ent o MRS, en el caso del control, *L. reuteri*. Las placas se incubaron 24-48 h a  $37^\circ\text{C}$  y transcurrido ese tiempo se contaron el número de UFCs (figura 23).

Los resultados se expresaron como n° total de UFCs translocadas/ml para cada periodo de muestreo y los valores de TER se expresaron como porcentajes de TER respecto al valor basal de cada pocillo,  $t=0$  ( $\text{TER}_x/\text{TER}_{\text{basal}}$ ).

La capacidad de translocación de los aislados, en función del número total de bacterias translocadas a tiempo final (UFC/ml a  $t=8$  h), se clasificó en: **baja**, cuando estuvo comprendida entre **1-2 log**; **media**, cuando sus valores oscilaron entre **2-4 log** o **alta**, cuando los valores fueron **superiores a 4 log**.

Este ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada uno de los aislados estudiados y en al menos tres días independientes.



**Figura 23.** Esquema del ensayo de translocación. Tras una media de 12-15 días en cultivo, se añadieron los inóculos bacterianos a las monocapas celulares de los compartimentos apicales de los sistemas Transwell. La capacidad de translocación se estableció determinando el n° total de UFC/ml translocadas en cada punto de muestreo para cada uno de los aislados.

## 6. Formación de biopelículas *in vitro*

La capacidad de formación de biopelículas sobre distintas superficies se evaluó empleando el método del cristal violeta [241], con algunas modificaciones. Para ello se realizaron cultivos *o.n.* de los distintos aislados en BHI y se realizaron diluciones en solución salina estéril al 0,9% para obtener inóculos de  $10^7$  UFC/ml, siguiendo los pasos descritos en el apartado 1. Se inocularon 100  $\mu$ l/pocillo de estas suspensiones en placas de 96 pocillos de poliestireno normales y también en placas tapizadas con colágeno I (cola de rata, Corning Inc, Thermo Fisher Scientific) o colágeno IV (ratón, Corning Inc, Thermo Fisher Scientific). Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h en agitación (30 r.p.m.) y tras la incubación, se lavaron los pocillos 3 veces con 200  $\mu$ l de PBS. A continuación, se dejaron secar las placas durante 1 h a temperatura ambiente y se añadieron 100  $\mu$ l de solución de cristal violeta al 0,2% (Panreac, Barcelona, España) a cada pocillo. Transcurridos 15 min, se retiró el cristal violeta, se realizaron tres lavados con 200  $\mu$ l de PBS y se solubilizó la biopelícula unida al cristal violeta en 200  $\mu$ l de una solución de etanol-acetona (75:15, v/v). La medida de la absorbancia a 600 nm ( $DO_{600}$ ), representativa de la cantidad de biopelícula formada, se midió en el espectrofotómetro automático Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific). En función de estos valores, los aislados se clasificaron como: no formadores de biopelículas,  $DO_{600} < 0,120$ ; formadores débiles,  $DO_{600} \leq 0,240$ ; o formadores fuertes,  $DO_{600} > 0,240$ . Estos experimentos se repitieron al menos por triplicado en 3 días independientes.

## 7. Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos de translocación se analizaron utilizando un modelo de regresión lineal multinivel mixto. Se estimaron los efectos aleatorios para las variables día del experimento ( $n=3$ ) y réplica ( $n=15$  para cada aislado) que además fueron considerados niveles de agrupamiento. Los valores de translocación, expresados como UFC/ml se transformaron logarítmicamente para conseguir una distribución normal y poder aplicar este modelo. Esta variable logarítmicamente transformada se ajustó usando las variables aislado, tiempo y porcentaje del TER sobre el basal ( $\%TER/TER_{basal}$ ) como efectos fijos para el modelo. El nivel de significación estadística se estableció en 5% para todos los análisis y los resultados se refirieron al aislado Efm222, que se empleó como control.

Los resultados de la formación de biopelículas, expresados como valores medios de  $DO_{600}$ , y los de los ensayos de adhesión e invasión se compararon empleando el test U de Mann-Whitney. Los análisis estadísticos se realizaron empleando la versión 11.0 del software STATA<sup>TM</sup> (StataCorp Lp, Texas, EE. UU.).



## RESULTADOS

### 1. Grado de diferenciación celular

Para evaluar el grado de diferenciación celular de los cultivos empleados en los ensayos de adhesión e invasión, se emplearon varias tinciones inmunohistoquímicas, además de la verificación mediante microscopía invertida. Empleando anticuerpos marcados con distintos fluoróforos se tiñeron las proteínas implicadas en la adhesión intercelular (E-cadherina, componente de las uniones adherentes, y zonula occludens-1, ZO-, proteína estructural de uniones estrechas) y en la formación de los complejos de adhesión focal (actina y paxilina).

Las imágenes tomadas mediante microscopía confocal mostraron una distribución uniforme de la proteína E-cadherina en la membrana celular de las células de la monocapa y una tinción de zonas discretas de membrana que se correspondieron con ZO-1, inmediatamente por debajo de la localización celular de la E-cadherina (figura 24).

La tinción de las proteínas Paxilina y Actina (teñida mediante faloidina) permitió demostrar su co-localización a nivel celular basal, lo que indicó un correcto ensamblaje del complejo de adhesión focal (figura 24). Las imágenes de las proyecciones ortogonales superiores mostraron la formación de los anillos de actina y la aparición de microvellosidades en el extremo apical de las células, mientras que en las proyecciones inferiores se visualizaron las fibras de estrés de actina.

Las imágenes de microscopía de fases mostraron la formación de una monocapa de células confluyente y estructuralmente intacta en la que pudieron apreciarse regiones con vesículas de mucus secretado por las células.

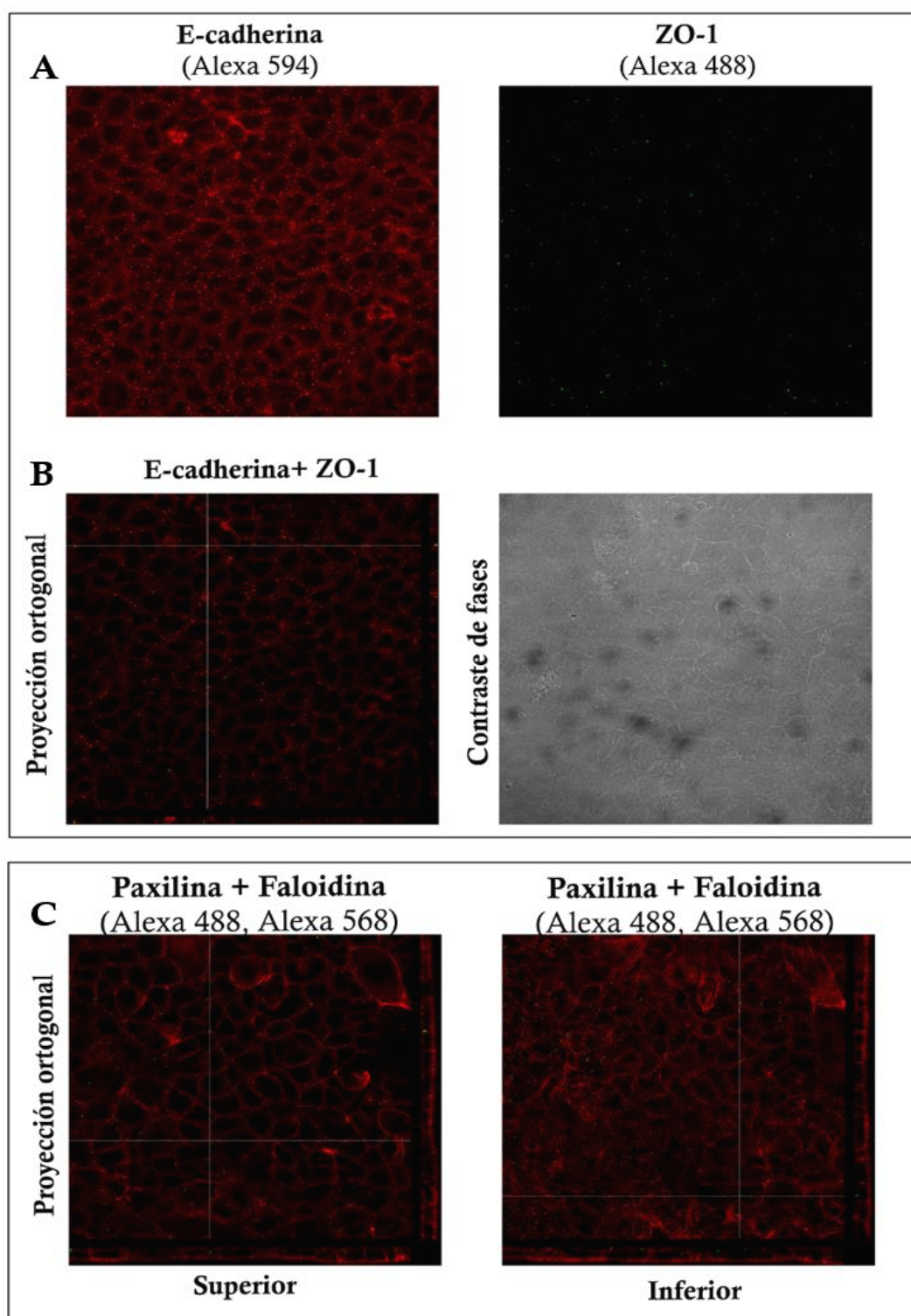
### 2. Adhesión e invasión celular

De manera general, los aislados de *E. faecium* demostraron una mejor capacidad adhesiva (valor medio 1,7%) a las células Caco-2 que los aislados de *S. gallolyticus* (valor medio 0,4%). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (figura 25).

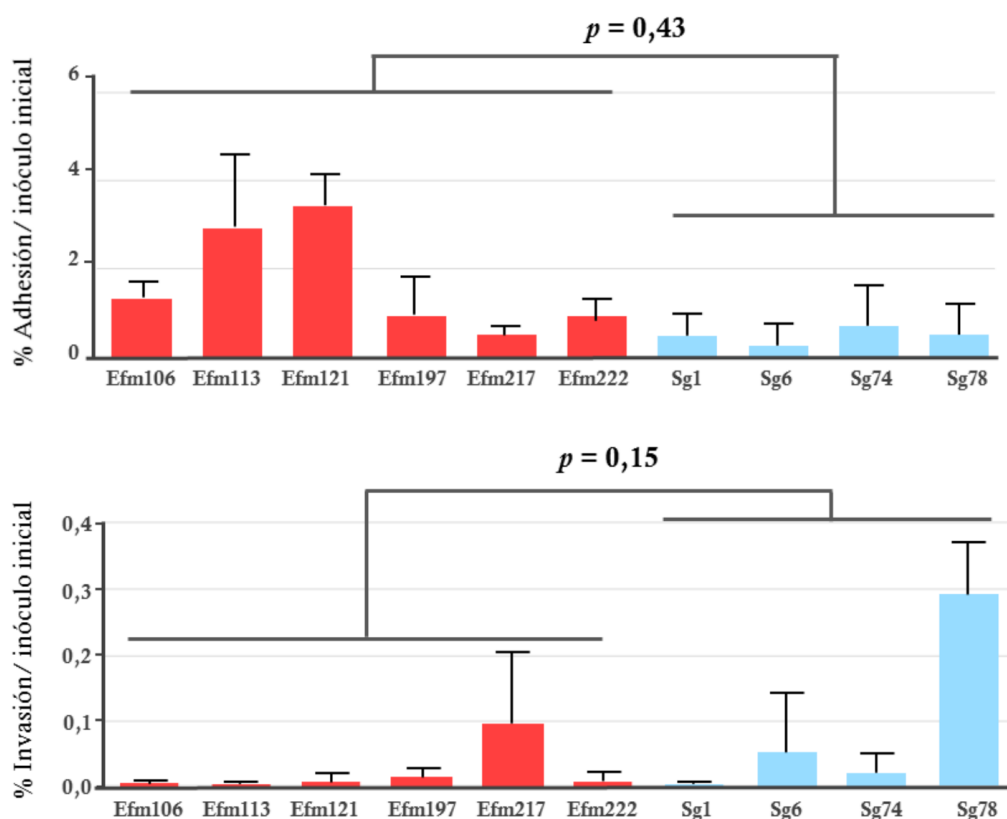
Los aislados de *E. faecium* Efm106, Efm113, Efm121 y Efm197 (todos *esp+* y *acm+*), procedentes de colonización intestinal de pacientes oncohematológicos, demostraron una capacidad de adhesión media de 2-6 veces superior a la de los aislados de *S. gallolyticus*.

Ninguno de los aislados seleccionados para este estudio exhibió una capacidad de invasión destacable. De hecho, la capacidad de invasión fue, en todos los casos, inferior al 0,1% del inóculo inicial, con la excepción del aislado de *S. gallolyticus* Sg78. Este aislado, pese a demostrar una capacidad de adhesión relativamente baja (0,43%), presentó la mayor capacidad de invasión (0,28%), seguido de *E. faecium* Efm217 (0,09 %) y *S. gallolyticus* Sg6 (0,045%). Para el resto de aislados se detectó una capacidad de invasión muy baja (media: 0,015%, rango: 0,01-0,02%).





**Figura 24.** Evaluación de la integridad de la monocapa de células Caco-2 mediante tinción inmunofluorescente de las proteínas ZO-1, E-cadherina, Paxilina y Actina. **(A)** Distribución de las proteínas E-cadherina (rojo) y ZO-1 (verde) en la monocapa celular (microscopía confocal). **(B)** La imagen de la izquierda muestra la co-localización de E-cadherina y ZO-1, así como la ubicación de ZO-1 por debajo de la E-cadherina. A su derecha, en la imagen de contraste de fases se observa la formación de una monocapa intacta y confluyente. **(C)** Distribución de la Paxilina (verde) y de la actina polimerizada (rojo-unión con faloidina) a nivel celular medio (izquierda) y basal (imagen derecha).



**Figura 25.** Adherencia (superior) e invasión (inferior) de las células Caco-2 de los aislados de *E. faecium* y *S. gallolyticus*. Los resultados se expresan como los porcentajes medios de adhesión o invasión respecto a los inóculos de partida. Las diferencias entre grupos se compararon utilizando el test estadístico U-Mann Whitney.

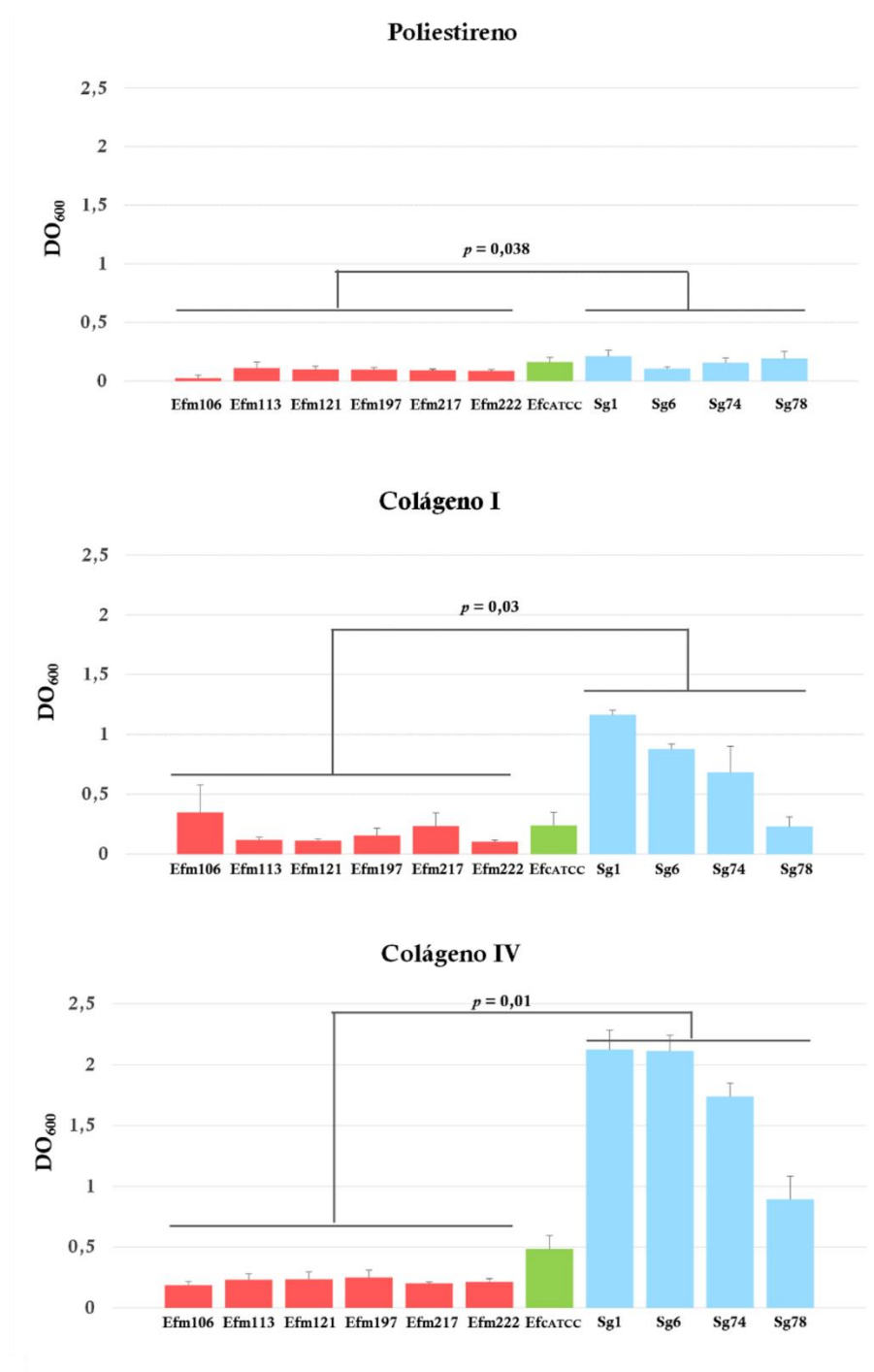
#### 4. Formación de biopelículas *in vitro*

La formación de biopelículas fue bastante heterogénea y difirió notablemente entre las dos especies y entre los distintos sustratos utilizados. Los aislados de *S. gallolyticus* fueron capaces de producir biopelículas de una manera más eficiente y significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que los aislados de enterococos (*E. faecium* y *E. faecalis*) sobre cualquiera de las tres superficies seleccionadas para el ensayo, con independencia del origen. Además, los aislados de *S. gallolyticus* formaron una biopelícula bastante sólida sobre las superficies tapizadas con colágeno I (DO<sub>600</sub> 0,23-1,16) y de manera particular, sobre las revestidas con colágeno IV (DO<sub>600</sub> 0,89-2,12).

Por el contrario, los aislados de *E. faecium* presentaron un patrón similar de producción de biopelículas, siendo éste ausente cuando la superficie utilizada fue poliestireno (0/6); débil (2/6) o ausente (3/6) cuando se emplearon superficies revestidas con colágeno I y débil (5/6) o fuerte (1/6) cuando la superficie empleada fue colágeno IV (figura 26).



La cepa control *E. faecalis* ATCC 29212 fue capaz de formar biopelículas sobre cualquiera de las tres superficies de manera similar a los aislados de *E. faecium*.



**Figura 26.** Producción de biopelículas sobre distintas superficies: poliestireno, colágeno I y colágeno IV. Los aislados se clasificaron como no productores ( $DO_{600} < 0,120$ ), productores débiles ( $0,120 < DO_{600} \leq 0,240$ ) o altos productores ( $DO_{600} > 0,240$ ). Los resultados se expresan como valores medios ( $\pm$  SD). La comparación entre grupos se llevó a cabo mediante el test estadístico U-Mann Whitney.

Los aislados de *S. gallolyticus* recuperados de episodios de bacteriemia (Sg1 y Sg6) produjeron biopelículas sobre las superficies tapizadas con colágeno de manera muy superior a cualquiera del resto de aislados, tanto de la misma especie como de *E. faecium*. Sin embargo, esta observación careció de significación estadística.

### 3. Translocación bacteriana

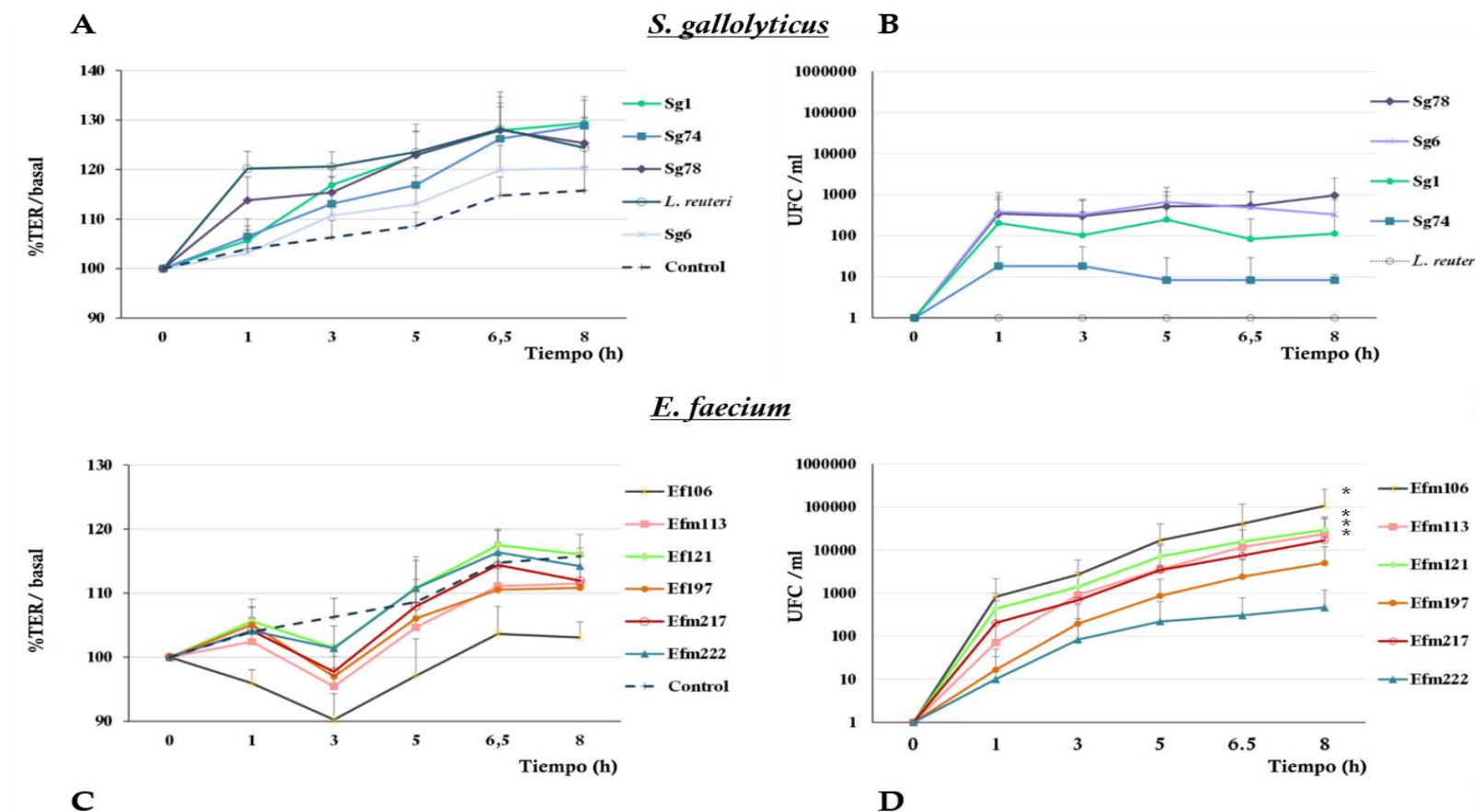
La monitorización de los valores de TER al comienzo y durante el desarrollo de los experimentos de translocación, reveló la existencia de dos patrones de respuesta celular tras la adición de los inóculos bacterianos. Por un lado, *S. gallolyticus* y *L. reuteri* indujeron un incremento paulatino en los valores de TER con respecto a sus valores basales, y siempre por encima del valor de TER del control negativo. Por el contrario, los aislados de *E. faecium* ocasionaron una disminución inicial de los valores de TER seguida de un incremento y recuperación posteriores. Este efecto podría deberse a un efecto inicial desestabilizador de la membrana que podría recuperarse a partir de las 3 h.

Todos los aislados bacterianos, tanto de *E. faecium* como de *S. gallolyticus*, demostraron capacidad para translocar *in vitro*, en las condiciones experimentales utilizadas. No obstante, cabe destacar que los aislados de *E. faecium*, con la excepción de Efm222 (procedente de colonización intestinal de un paciente externo), fueron capaces de atravesar la monocapa de células Caco-2 más eficientemente que los pertenecientes a la especie *S. gallolyticus* (figura 27).

En todos los casos, la capacidad de translocación de los aislados de *S. gallolyticus* fue baja (Sg74) o media (Sg1, Sg6 y Sg78) mientras que la de los aislados de *E. faecium* fue como media (Efm222) o alta (Efm106, Efm113, Efm121, Efm197 y Efm217). El aislado de *L. reuteri* utilizado como control, no exhibió capacidad para translocar en ninguno de los experimentos realizados.

El modelo estadístico de regresión lineal multinivel sólo pudo aplicarse al estudio del comportamiento de los aislados de *E. faecium* ya que, en el caso de *S. gallolyticus*, la distribución de la variable dependiente (número de UFC) no se ajustó a la normalidad. La aplicación de este modelo reveló que no existieron diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de translocación (UFC/h) de los aislados de *E. faecium* y que la translocación incrementaba 0,79 log de media por hora (95% CI: 0,59-0,99). Además, se encontró que incrementos en el valor de la TER de 1% se correlacionaron con una disminución de la translocación en 0,04 log ( $p=0,021$ ) para todos los aislados con independencia del tiempo.

Los aislados Efm106 y Efm121 translocaron significativamente más que el resto de *E. faecium* (salvo Efm103) ( $p<0,05$ ). Asimismo, la capacidad de translocación de todos los aislados, con la excepción de Efm197, fue significativamente mayor que la del aislado Efm222. Los resultados de este estudio se recogen en la tabla 15.



**Figura 27.** Evolución temporal de la TER y translocación de los aislados de *S. gallolyticus* (A y B respectivamente) y de *E. faecium* (C y D respectivamente). Los valores de TER se expresan como los valores medios de TER para cada tiempo con respecto al valor basal (%TER/basal). La translocación se expresa como la media de UFC/ml ( $\pm$ SD) y los resultados se compararon con el aislado Ef222, \* $p < 0,05$ .

**Tabla 15.** Resumen de la capacidad de translocación, adhesión, invasión y formación de biopelículas *in vitro*.

Especie	Aislado	% TER/ basal (min-max)	Translocación		Adhesión	Invasión	Producción de biofilm		
			Coefficiente	Clasificación			Poliestireno	Colágeno-I	Colágeno-IV
<i>E. faecium</i>	Efm106	90,2-103,6	3,70 (2,57-4,82)	Alta	Alta	Baja	No	Fuerte	Débil
<i>E. faecium</i>	Efm113	95,4-112,2	3,17 (2,11-4,24)	Alta	Alta	Baja	No	No	Débil
<i>E. faecium</i>	Efm121	98-114	3,70 (2,65-4,75)	Alta	Media	Baja	No	No	Débil
<i>E. faecium</i>	Efm197	96,9-110,8	0,87 (0,19-1,93)	Media	Baja	Baja	No	Débil	Fuerte
<i>E. faecium</i>	Efm217	97,02-111,9	2,16 (1,10-3,21)	Alta	Baja	Baja	No	Débil	Débil
<i>E. faecium</i>	Efm222	101,3-116,3	--	Media	Baja	Baja	No	No	Débil
<i>S. gallolyticus</i>	Sg1	105,7-128,9	NA	Media	Baja	Baja	Débil	Fuerte	Fuerte
<i>S. gallolyticus</i>	Sg6	103,1-125,2	NA	Media	Baja	Baja	No	Fuerte	Fuerte
<i>S. gallolyticus</i>	Sg74	106,4-127,2	NA	Baja	Baja	Baja	Débil	Fuerte	Fuerte
<i>S. gallolyticus</i>	Sg78	113,2-128,3	NA	Media	Media	Media	Débil	Débil	Fuerte
<i>E. faecalis</i>	Efc29212	--	--	--	--	--	Débil	Débil	Fuerte
<i>L. reuteri</i>	Lr925	--	--	No	--	--	--	--	--

Abreviaturas: TER, resistencia transepitelial; NA, no aplica.







“Lo que ahora está demostrado en algún momento sólo se imaginó”

William Blake

### CAPÍTULO III



---

**Transmisión de *Enterococcus faecium* Asociado al Ambiente Hospitalario: Caracterización de un Brote Silente de *E. faecium* Resistente a Vancomicina en un Hospital de Tercer Nivel en Madrid: Importancia de la Transmisión**





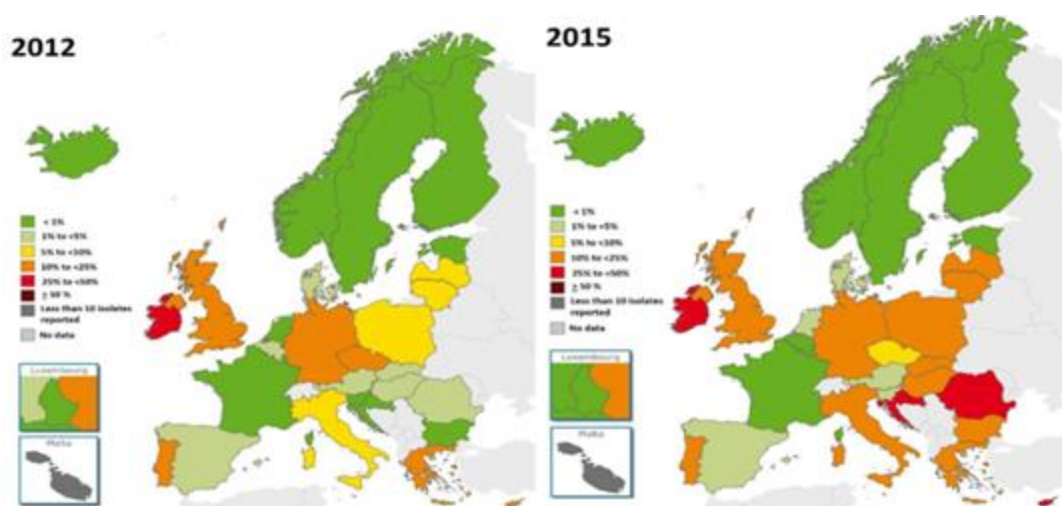
## ANTECEDENTES

### 1. Enterococos resistentes a glucopéptidos

#### 1.1. Epidemiología en Europa

Los primeros aislamientos de *E. faecium* resistentes a vancomicina (EfRV) se comunicaron en 1988 en Reino Unido y Francia. Inicialmente su prevalencia en Europa era alta en portadores asintomáticos y animales de granja, pero apenas se comunicaron aislamientos en los hospitales europeos durante la década de los 80 [36]. Las altas tasas de colonización detectadas en animales de granja se relacionaron epidemiológicamente con el uso de avoparcina, un análogo de la vancomicina, como promotor del crecimiento animal. Pese a la falta de evidencia de que los EVR pudieran diseminarse en humanos y causar infecciones graves, la Unión Europea decidió prohibir en 1996 el uso de la avoparcina en ganadería [125,126]. Esta decisión vino motivada, en parte, por el miedo de que una situación endémica, como la observada en EE.U.U. pudiera producirse en Europa y se sucedió con la prohibición, en la década de los 2000, de todos los antimicrobianos empleados como promotores del crecimiento [36].

El incremento en las tasas de infección por EVR no se produjo en Europa hasta casi una década después, cuando se observó una disminución de la resistencia a los glucopéptidos en los reservorios comunitarios, principalmente pollos, cerdos y otros animales de granja [242,243]. Inicialmente, sólo se describieron algunos brotes ocasionales en unidades con pacientes de alto riesgo como UVI, unidades de hematología, nefrología y trasplantados. No obstante, a partir del año 2000, se han sucedido la aparición de brotes por EfRV en los hospitales de toda Europa, en su mayoría producidos por una subpoblación de *E. faecium* con alta resistencia a ampicilina y fluoroquinolonas [36]. Hoy se sabe que esta subpoblación altamente adaptada al hospital y antiguamente clasificada dentro del complejo clonal CC17, se engloba dentro de los grupos BAPS 2.1a y BABPS 3.3a, y se caracteriza por tener un contenido genético adicional (genoma accesorio) y varios factores supuestamente asociados con una mayor virulencia [165,166].



**Figura 28.** Evolución de la resistencia a vancomicina (2012 y 2015) en aislados invasivos de *E. faecium* en los diferentes países europeos. (fuente: Informe EARS-Net 2016)

## 1.2. Sistemas de vigilancia europeos

En la actualidad existen en Europa varios programas de vigilancia epidemiológica nacionales y comunitarios que se encargan, entre otras, de recopilar datos de resistencia a vancomicina en los enterococos. Algunos países, como Austria, Alemania o Francia tienen implantado un sistema de vigilancia obligatorio, mientras que otros tienen una cobertura limitada a determinados establecimientos sanitarios o incluso, en otros países, es inexistente [127].

El Sistema de Vigilancia de la Resistencia Antibiótica Europeo (EARS-Net) se fundó en 1998 (inicialmente bajo el acrónimo de EARSS) y es el mayor sistema, con financiación pública, para la vigilancia de la resistencia antibiótica en Europa. Este sistema se encarga de recoger información acerca de la resistencia que presentan determinadas bacterias “indicadoras” aisladas de muestras invasivas (bacteriemias), a determinados antimicrobianos. Entre ellas se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium* ([http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial-resistance-and-consumption/antimicrobial\\_resistance/EARS-Net/Pages/EARS-Net.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial-resistance-and-consumption/antimicrobial_resistance/EARS-Net/Pages/EARS-Net.aspx)).

En el último informe, publicado en 2016, han colaborado más de 30 países, incluyendo todos los estados miembros y dos de los tres países de la Comunidad Económica Europea (EEA), Islandia y Noruega.

Con respecto a la resistencia a la vancomicina, el informe EARS-Net concluye que, de manera similar a lo observado en años anteriores, es mucho más común en aislados de *E. faecium* que de *E. faecalis*. Además, la tasa de resistencia varió notablemente entre los distintos países (<1% en países como Noruega o Finlandia y >40% en Irlanda) (figura 28).

En este informe se pone también de manifiesto un incremento (entre los años 2012-2015) en el número de infecciones invasivas por EfRV en 12 de los 26 países que comunicaron más de 20 aislados por año. Aunque este incremento en el nivel de resistencia es muy pequeño (8,1% en 2012 y 8,3% en 2015) se observa una tendencia al aumento en determinados países, lo que podría indicar un cambio en la epidemiología de la resistencia a vancomicina en Europa [244].

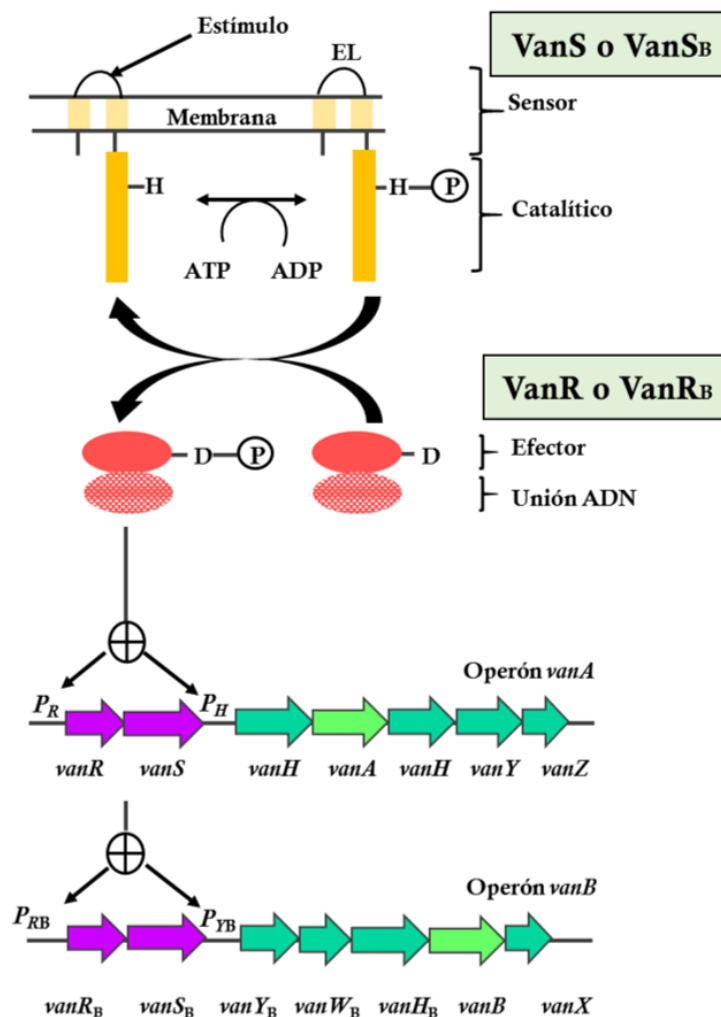
## 1.3. Genotipos más frecuentes y regulación de la resistencia a glucopéptidos

Como se avanzó en la introducción general, la resistencia a la vancomicina puede ser adquirida o constitutiva. Hasta la fecha se han descrito 8 genotipos distintos de resistencia adquirida a vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*) y uno de resistencia intrínseca (*vanC*). De todos ellos son los fenotipos *vanA* y *vanB* los que más frecuentemente se han aislado de muestras clínicas y se han asociado a brotes hospitalarios [36,74,127].

El operon *VanA*, que confiere resistencia de alto nivel a vancomicina y teicoplanina suele estar contenido en transposones *Tn1546* o relacionados y está compuesto por cinco tipos de genes implicados en la resistencia a glucopéptidos (*vanHAXYZ*) y dos genes regulatorios (*vanRS*). El gen *vanA* codifica para una ligasa que cataliza la formación del dipéptido alterativo D-Ala-D-Lac. Sin embargo, este gen no confiere resistencia a la vancomicina solo, sino que necesita de la expresión de otros genes incluidos en ese operón. El gen *vanH* codifica para una hidrogenasa que reduce el piruvato, sustrato muy frecuente en la naturaleza, a D-Lac. Mientras que los genes *vanX* y *vanY* codifican respectivamente para una D, D-dipeptidasa que hidroliza el dipéptido nativo D-Ala-D-Ala; y para una D, D-carboxipeptidasa, que elimina el residuo D-Ala terminal, en caso de que no actúe correctamente la dipeptidasa. Existe un gen adicional, *vanZ*, cuyo papel en la resistencia a vancomicina se desconoce en la actualidad [74].

El operón VanB confiere resistencia moderada-alta a vancomicina pero no se induce por teicoplanina. Su adquisición suele estar asociada a los transposones Tn5382/Tn1549 que frecuentemente se insertan en el cromosoma, aunque también pueden ir contenidos en plásmidos. La organización genética de este operon es muy similar a vanA: contiene dos promotores que transcriben 7 marcos abiertos de lectura (ORFs) y tiene 3 genes implicados en la resistencia, homólogos a los del operon vanA (*vanHAX*) y dos reguladores (*vanRB* y *vanSB*). Este operón carece de gen *vanZ*, pero en su lugar tiene un gen *vanW*, cuya función no se sabe con certeza [74].

**Figura 29.** Mecanismo de regulación de la transcripción de los operones VanA y VanB (modificado de Arthur y cols. 2001, [245]).

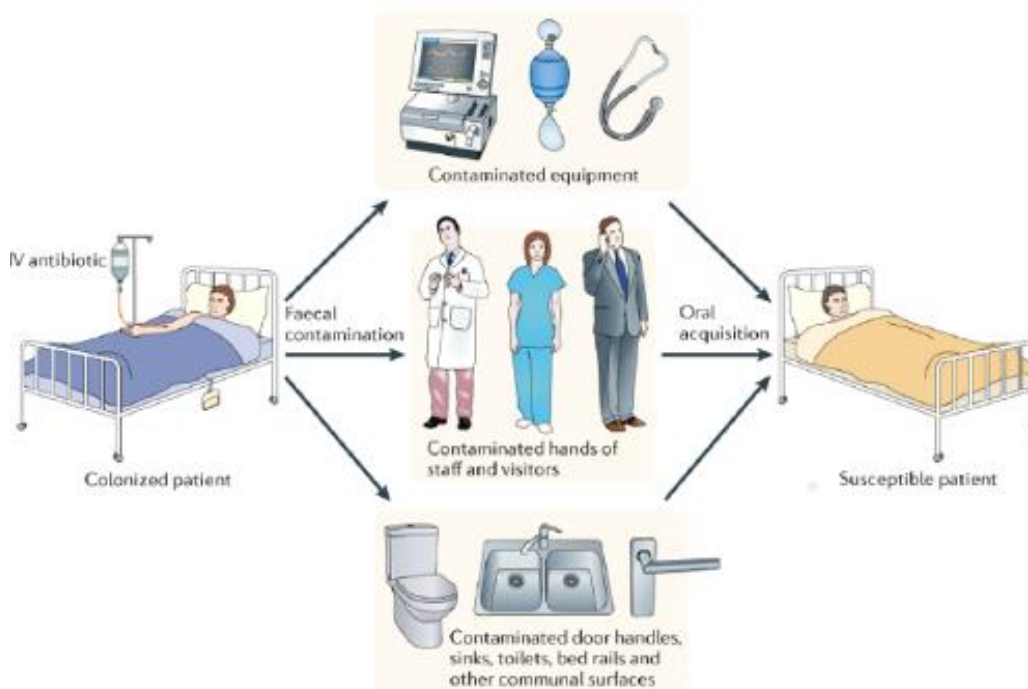


La expresión de la resistencia a los glucopéptidos se encuentra regulada por un sistema de trasducción de señales de dos componentes (VanR/VanS). La proteína VanS es una kinasa que se encuentra en la membrana y que actúa como sensor. Cuando existe vancomicina en el medio, se activa y autofosforila un residuo de histidina en el lado citoplasmático de la membrana. El grupo fosfato se transfiere a un residuo de aspartato de la proteína reguladora VanR que conduce a su dimerización. Esto potencia la unión de VanR a los promotores del

operón y desencadena un incremento de su transcripción (tanto de los genes reguladores como responsables directos de la resistencia). Cuando desaparece la vancomicina del medio, la proteína VanS actúa como fosfatasa de VanR, impidiendo así que se mantenga activada la transcripción del operón [245,246]. Se han descrito mutaciones en el gen *vanS* que alteran o eliminan por completo la actividad fosfatasa de esta proteína, conduciendo a la expresión constitutiva de la resistencia a vancomicina. Aunque la regulación de la expresión de los operones VanA y VanB recae en sistemas de señalización bicomponentes, existen notables diferencias entre estos sistemas regulatorios (figura 30).

## 2. Transmisión

*E. faecium*, como el resto de enterococos, es capaz de sobrevivir a altas temperaturas y a la acción del cloro y algunas soluciones alcohólicas. Esto unido a su capacidad de permanecer largos periodos de tiempo sobre distintas superficies ambientales, facilitan su diseminación en el medio ambiente hospitalario [247].



**Figura 30.** Principales rutas propuestas en la transmisión de enterococos en el hospital.

## 2.1. Fuentes de infección y reservorios

Hasta hace pocos años se pensaba que la principal fuente de infección enterocócica, en la gran mayoría de pacientes, era su propio TGI. Sin embargo, como se ha explicado previamente, en el caso de *E. faecium*, se debe a una subpoblación genéticamente diferente de la que coloniza el intestino de personas sanas.

Se han propuesto dos rutas principales en la transmisión de EVR entre pacientes, que son válidas también para *E. faecium* que no presentan resistencia a vancomicina. La primera tendría lugar a través de las manos del personal sanitario [248] y la segunda vía, mucho más probable, involucraría la colonización por aislados de *E. faecium* asociados al hospital (alto riesgo) del TGI de los pacientes. En este último caso las cepas de EfVR pasarían a formar parte de la microbiota de aquellos pacientes con una baja resistencia a la colonización y en última instancia sobrecrecerían, favoreciendo su diseminación y aumentando las probabilidades de producir infección [249].

El medio ambiente hospitalario también tiene un papel importante en la transmisión de *E. faecium* ya que los mismos clones detectados en pacientes se han encontrado en diversos instrumentos médicos como termómetros o estetoscopios [250].

## 2.2. Factores dependientes del hospedador

Varios estudios han definido los factores de riesgo para la colonización intestinal por EVR. Entre ellos destacan el tratamiento previo con vancomicina, cefalosporinas de tercera generación o antibióticos con actividad antianaeróbica. Además, se ha descrito que la exposición a otros pacientes colonizados por EVR, ya sea por proximidad física o a través del personal de enfermería aumenta el riesgo de colonización por EVR [130,248].

## 3. Control de la infección

Con el objetivo de disminuir el número de infecciones por EfVR que puedan producirse en un hospital, es importante que se lleven a cabo una serie de medidas encaminadas a disminuir la diseminación de este microorganismo. Cada institución debe, en función de sus características (tasas de infección, tipo de pacientes, infraestructura o personal especializado) realizar un programa de control de infección apropiado [251].

La presencia de infecciones graves en un número elevado de pacientes puede requerir el tipado molecular de los aislados de EfVR para discernir si se trata de un brote y poder incidir en la cadena de transmisión.

### 3.1. Vigilancia epidemiológica

La implantación de un sistema de vigilancia activa de los pacientes asintomáticos en riesgo de colonización es uno de los pilares en el control de la diseminación de microorganismos multirresistentes. El objetivo principal es identificar a cada paciente colonizado para poder aplicar medidas de aislamiento por contacto y disminuir así la transmisión del microorganismo en cuestión [252].

La realización de cultivos de vigilancia epidemiológica periódicos se recomienda en aquellos pacientes con un alto riesgo de colonización/infección por EfVR, ya sea por el tratamiento antibiótico que recibe, enfermedad subyacente o duración de la estancia hospitalaria. Este tipo de medida se recomienda en centros con una prevalencia alta de EVR [253].

El aislamiento por contacto podrá levantarse una vez que el paciente ya no esté colonizado por EfRV. El Comité Asesor de Prácticas de Infección Hospitalaria americano (HICPAC) considera que existe un aclaramiento de la colonización por EVR cuando existan al menos tres cultivos de torundas rectales consecutivos negativos (HICPAC) [253]

### **3.2. Otras medidas de control de infección**

En los centros de cuidados intensivos, el establecimiento de precauciones estándar y de aislamiento por contacto son la piedra angular en el control de la infección por EVR. Dentro de las precauciones estándar encaminadas a disminuir la transmisión, destacan el uso de guantes, pero especialmente el lavado de manos.

Otras medidas importantes en el control de la infección nosocomial son la formación específica en control de infección del personal sanitario y el desarrollo de programas institucionales para la optimización del uso de antibióticos (PROA) [253].

### **3.3. Papel del laboratorio de microbiología**

Los laboratorios de Microbiología tienen un papel muy importante en el diagnóstico precoz de las infecciones/colonizaciones debidas a EVR. En base a esta rapidez se podrán comunicar los resultados al equipo responsable de control de infección, enfermeras o médico responsable, para que puedan aplicarse las medidas epidemiológicas oportunas.

Todavía en la actualidad el método diagnóstico más frecuente son los cultivos de vigilancia, generalmente con medios selectivos para enterococos suplementados con vancomicina, o lo que es mejor, empleando medios selectivos cromogénicos. Sin embargo, los métodos de cribado molecular tienden a imponerse por su rapidez y sensibilidad [254].



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad la prevalencia de infecciones invasivas por EVR en España es muy baja (2,5%). Sin embargo, se ha producido un aumento en los cuatro últimos años. La circulación de EVR a nivel hospitalario y el aumento de colonización de pacientes en riesgo de sufrir una infección no se puede detectar a menos que se lleven a cabo programas de vigilancia activa.

En el Hospital Ramón y Cajal la prevalencia global de infecciones por EVR en los últimos 10 años se ha mantenido inferior al 1%. La detección creciente de unas colonias atípicas en los medios cromogénicos empleados en los cultivos de vigilancia de Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) y su identificación como *E. faecium* resistente a vancomicina nos hizo sospechar que podríamos encontrarnos ante un brote encubierto de EfmRV en nuestro hospital.

Los objetivos que se plantearon para este capítulo fueron los siguientes:

1. Describir el aumento de prevalencia en la colonización por EVR en pacientes ingresados en un hospital terciario con una situación endémica de Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) y las medidas implantadas para su control epidemiológico.
2. Caracterizar la estructura poblacional de los aislados de EVR para discernir si se trataba de un brote, así como los elementos genéticos (plásmidos y transposones) que confieren resistencia a los glucopéptidos
3. Evaluar la capacidad de transmisión dedo-dedo de diferentes aislados de *E. faecium* en un grupo de voluntarios, que trabajan como personal sanitario en nuestro hospital terciario.





## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Descubrimiento del brote

El Hospital Ramón y Cajal tiene implantado un sistema de vigilancia activa para la detección de pacientes infectados y colonizados por EPC, siguiendo las recomendaciones del Plan de Prevención y Control frente a la infección por EPC en la Comunidad de Madrid del año 2013 ([http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1354274526068&language=es&pagename=PortalSalud%2FPage%2FPTSA\\_pintarContenidoFinal&vest=1354274526068](http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1354274526068&language=es&pagename=PortalSalud%2FPage%2FPTSA_pintarContenidoFinal&vest=1354274526068)). En él, se recomienda, entre otras medidas, la búsqueda activa, mediante cultivos de vigilancia epidemiológica, de pacientes portadores de EPC principalmente a nivel rectal, pero también en muestras respiratorias.

Durante el mes de agosto de 2015 y durante la inspección diaria de los cultivos de vigilancia epidemiológica de torundas rectales, se detectaron de manera sistemática unas colonias pequeñas de color morado-azul en los medios selectivos para el aislamiento de EPC y de bacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (chromID® CARBA y chromID ESB, BioMérieux, Francia) (figura 31). Estas bacterias se identificaron como *E. faecium* por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS, Bruker, Billerica, Massachusetts, EE.UU.) y, dado que estos medios contienen vancomicina (además de otros antibióticos que garantizan su selectividad para Enterobacterias), se analizó su sensibilidad a vancomicina y teicoplanina mediante la técnica de difusión con disco. Para ello se siguieron las recomendaciones y criterios de interpretación de EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org), [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)). Eucast clinical breakpoints table v5.0 2015-01-01: vancomicina: sensible  $\geq 12$  mm, resistente  $< 12$  mm; teicoplanina: sensible  $\geq 16$  mm, resistente  $< 16$  mm). A partir de este momento, todas las colonias de estas características identificadas como *Enterococcus* que presentaron resistencia a glucopéptidos (EVR) (no pertenecientes a las especies *E. gallinarum* ni *E. casseliflavus*), se congelaron en glicerol al 15% para su posterior caracterización, así como los aislados recuperados de muestras clínicas. Únicamente se archivó y caracterizó el primer aislado de colonización detectado en cada paciente.



**Figura 31.** Crecimiento de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (EVR) detectados en los medios selectivos para EPC y Enterobacterias productoras de BLEEs.

## 2. Estudio de clonalidad: PFGE y MLST

Para determinar si los aislados de EVR estaban genéticamente relacionados y por lo tanto si este hallazgo casual podía tratarse en realidad de un brote se emplearon dos técnicas de tipado molecular: PFGE y MLST. La caracterización mediante MLST sólo se llevó a cabo en un representante por clon (PFGE). Para ello se siguieron las indicaciones detalladas en los apartados 5.1. y 5.2 del capítulo I. Adicionalmente cada uno de los clones se clasificó dentro de un grupo de BAPS, en función de su ST y de acuerdo a la clasificación propuesta por Tedim y cols [166].

## 3. Estudio de sensibilidad antibiótica

### 3.1. Métodos fenotípicos

La sensibilidad antibiótica de los aislados de EVR a los principales antibióticos de utilidad clínica frente a este microorganismo, se determinó por microdilución mediante el sistema semi-automático WIDER (Soria Melguizo) siguiendo la metodología definida en el apartado 6.1. del Capítulo I.

Además, para determinar el valor de CMIs para los glucopéptidos vancomicina y teicoplanina, se emplearon tiras de difusión en gradiente (Etest®, BioMérieux, Francia) que se aplicaron sobre placas de agar Müeller-Hinton siguiendo las recomendaciones de EUCAST. Las CMIs se definieron como aquellas concentraciones que produjeron la inhibición del 90% del crecimiento bacteriano.

## 4. Caracterización molecular de la Resistencia a glucopéptidos

### 4.1. Detección de genes *van*

La determinación del genotipo de resistencia se basó en la amplificación y detección de un fragmento interno del gen que codifica para la D-Ala-D-ala ligasa [255]. Para ello se realizaron dos PCRs distintas con los cebadores y Tm detallados en la tabla y siguiendo las indicaciones de los apartados 5.2.1., 5.2.2. y 5.2.3. del Capítulo I. Se empleó como control positivo la cepa *E. faecium* BM4165.

### 4.2. Determinación de la localización genómica de los elementos *van*

La localización genómica (cromosómica o plasmídica) de los elementos *van* se determinó mediante hibridación con sondas de *vanA/vanB/23S* rADN (Southern blot) del ADN de estos aislados previamente digeridos con la enzima *I-CeuI* y *S1* nucleasa. La enzima *I-CeuI* reconoce dianas de restricción de ADN cromosómico correspondientes a regiones específicas del operón 23S de genomas bacterianos. Por el contrario, la enzima *S1* nucleasa, degrada ADN y ARN de cadena sencilla (aunque es 5 veces más activa sobre ADN) y se emplea para conocer el contenido plasmídico de una bacteria.

Para determinar la localización genómica de los elementos *van* se seleccionó una cepa por cada uno de los clones diferentes detectados por campo pulsado. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes: **separación**, **transferencia** y **fijación del ADN** a una membrana de nitrocelulosa, **marcaje** de sondas, **hibridación** del ADN y **revelado** de las membranas.

**a) Separación**

Previo a la separación de los fragmentos de ADN, éste se inmovilizó en tacos de agarosa al 1% (apartado 5.1. del Capítulo I). Se escindió aproximadamente un tercio de cada bloque de agarosa y se incubaron: i) uno con 100 µl de una solución de digestión de ***S1 nucleasa*** [256] (concentraciones finales: 14 U/µl enzima, y 1x tampón, Takara Bio Inc, Kyoto, Japón) a 37°C durante 15 min; ii) otro con 100 µl de una solución de digestión de ***I-CeuI*** (concentraciones finales: 5 U/µl enzima, 1x tampón 4N y 0,1% BSA, New England BioLabs Inc) a 37°C *o.n.* Como marcador de peso molecular se empleó el fago λ digerido con *PstI* y marcado con digoxigenina (PCR DIG Labeling Mix, Roche, Basilea, Suiza). Estos bloques se embebieron en geles de agarosa al 1,2% y se llevó a cabo la separación de los fragmentos siguiendo las especificaciones del apartado 5.1. del Capítulo I, pero empleando dos rampas (a) pulsos de 5-25 seg, durante 6 h y (b) pulsos de 30-45 seg, durante 12 h para ***S1nucleasa***, y una única rampa (pulsos de 1-20 seg durante 24 h) para ***I-CeuI***. La visualización de los fragmentos se llevó a cabo de acuerdo a los dispuesto en el apartado 5.1.d. del Capítulo I.

**b) Transferencia**

Tras la tinción y visualización de los geles, éstos se expusieron 2 min a luz ultravioleta y se desnaturalizaron durante 40 min en una solución de NaOH 0,5M / NaCl 1M. A continuación, se realizaron una serie de lavados con agua destilada y se estabilizó la membrana en una solución neutralizante de NaCl 3M / Tris HCl pH 7,8; 0,5M durante 1h en agitación. La transferencia se realizó por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond N+, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) se realizó *o.n.*

**c) Fijación del ADN**

Al día siguiente se fijó el ADN a la membrana mediante la exposición durante 2 min de la membrana a luz ultravioleta en el transiluminador (Chemidoc MP Imaging System, BioRad).

**d) Marcaje de las sondas**

Para la preparación de las sondas se llevó a cabo la amplificación de dos fragmentos internos de los genes *vanA*, *vanB* y 23S rADN empleando di-desoxinucleótidos trifosfato marcados con digoxigenina (PCR DIG Labeling Mix, Roche) empleando los cebadores y Tm detallados en la tabla X-cebadores y siguiendo las indicaciones de los apartados 5.2.1., 5.2.2. y 5.2.3. del Capítulo I.

**e) Hibridación de las membranas**

Las membranas se prehibridaron con solución de hibridación a 60°C durante un mínimo de 2h en el horno de hibridación Techne HB-1 (Techne Ltd, Cambridge, RU). A continuación, se añadió a esa solución, la sonda marcada con digoxigenina (cada sonda – *vanA*, *vanB* y 23S rADN - fue usada en un experimento independiente y la sonda de 23S rADN únicamente con la membrana en que el ADN había sido digerido con *I-CeuI*) y el fago λ desnaturalizados y se incubó en el horno de hibridación con agitación a 60°C *o.n.*

Al día siguiente se realizaron dos lavados de 5 min con 20 ml de SDS 0,1% / SSC 2x a temperatura ambiente seguidos de dos lavados de 15 min a 60°C y agitación con 20 ml de 0,1x SSC / 0,1% SDS. Seguidamente, se incubaron las membranas con 20 ml de tampón II (2 g reactivo de bloqueo + 200 ml tampón I 1x- 24,2 g Tris-HCl; 17,4 g NaCl; pH= 7,5) durante al

menos 30 min y a continuación se añadió a esta solución 4 µl del anticuerpo conjugado (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche). La incubación con el anticuerpo conjugado se mantuvo 30 min exactos, en agitación. Una vez finalizada esta incubación se realizaron dos lavados de 15 min con 20 ml de tampón I 1x para eliminar la fracción de anticuerpo no unida a la membrana.

#### **f) Revelado**

El revelado de las membranas se realizó mediante la incubación durante 5 min, en oscuridad, de éstas con un sustrato (CDP-Star Chemiluminescence substrate, Roche) que al ser defosforilado por acción de la fosfatasa alcalina produce un intermedio metaestable que se descompone emitiendo luz a 466 nm. La señal se detectó por exposición durante 20 min usando el aparato Chemidoc MP Imaging System (BioRad).

#### **g) Reutilización de membranas**

Cada vez que fue necesario incubar la membrana con otra sonda, se procedió de la siguiente forma: se aclaró con agua destilada la membrana y a continuación se realizaron dos lavados de 20 min con la solución de lavado (0,2 mol/L de NaOH y 0,1% de SDS). La membrana se estabilizó posteriormente durante 5 min en SSC 2x a temperatura ambiente y se conservó a 4 °C en una bolsa con TE pH=8 hasta su nueva utilización.

Para verificar la co-localización de las sondas de *vanA* y *vanB* con la sonda 23S rADN (indicaría localización en el cromosoma de los genes *van*) se superpusieron las fotos obtenidas de las hibridaciones de I-CeuI con los respectivos genes (*vanA* vs 23S rADN y *vanB* vs 23S rADN).

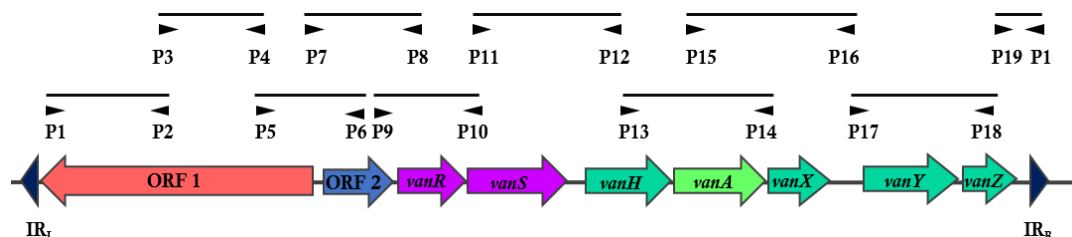
### **4.3. Caracterización de los transposones que codifican para la resistencia a glucopéptidos**

#### **4.3.1. Determinación de la estructura del transposón Tn1546**

El operón *vanA* suele estar contenido en un transposón tipo Tn3 (Tn1546) que está compuesto por cinco genes involucrados directamente en la resistencia a glucopéptidos (*vanHAXYZ*) y dos genes reguladores (*vanRS*). Aunque la gran parte de los enterococos que presentan el fenotipo VanA suelen presentar el operón completo, se han descrito variaciones debidas, entre otras causas, a la inserción de elementos genéticos móviles, como secuencias de inserción, en regiones intra e intergénicas de este transposón [257].

La estructura del transposón Tn1546 se determinó mediante la amplificación de 10 fragmentos solapantes del operón *vanA* (figura 32), utilizando 19 cebadores distintos (tabla 16) [257]. El ADN de una cepa de cada uno de los diferentes clones identificados por PFGE se extrajo siguiendo las indicaciones del apartado 5.2.1. del Capítulo I. Todas las reacciones se llevaron a cabo en termocicladores MJ Research PTC-100 (Global Medical Instrumentation Inc, EE. UU.) en un volumen final de 25 µl que contenía las siguientes concentraciones finales de reactivos (Pushion® High fidelity DNA polimerase, New England BioLabs Inc): tampón de reacción (1x, contiene MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM), mezcla de dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), cebadores directo y reverso (1pmol/µl cada uno), TaqPushion® polimerasa (0,25U) y agua libre de nucleasas. Para ello se emplearon las condiciones siguientes: 1 ciclo de activación a 98°C, 30 seg seguido de 30 ciclos de: desnaturalización a 98°C, 10 seg; hibridación durante 15 seg (temperaturas de *melting* (T<sub>m</sub>) en tabla 16); elongación a 68°C, 1 minuto y, por último, 1 ciclo a 72°C, 10 min.

La detección de los productos de amplificación se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.2.3. del capítulo I. Los geles de agarosa se prepararon al 0,8 %, cuando los fragmentos de amplificación tenían un tamaño esperado superior a 1 Kb, y al 2%, cuando estos eran inferiores a 1 Kb. Se utilizó como control positivo la cepa de *E. faecium* BM4165.



**Figura 32.** Estructura general del prototipo de operón *vanA* (Tn1546) y localización de los 10 fragmentos solapantes y los cebadores empleados en su amplificación. Abreviatura: IR: repetición invertida (Esquema modificado del propuesto por Woodford y cols. 1998 [257]).

Si alguno de estos fragmentos no amplificó y se sospechó que pudiera ser debido a la incorporación de una secuencia de inserción (IS), se empleó el cebador forward o reverso del fragmento anterior, empleando las mismas condiciones arriba descritas pero ampliando el tiempo de elongación a 1 minuto. Los productos se visualizaron, purificaron y se secuenciaron siguiendo las indicaciones de los apartados 5.2.3. y 5.2.4. del Capítulo I. Para los amplicones con tamaño superior a 1 Kb se empleó la técnica de *primer walking*. Esta técnica se emplea para fragmentos largos que no pueden secuenciarse completos mediante el método de Sanger empleando únicamente los cebadores forward y reverso usados para esa PCR. Se basa en el diseño de cebadores a unas 100 pb del final de la secuencia obtenida en la PCR inicial y la posterior secuenciación de los nuevos amplicones. Las nuevas secuencias se ensamblaron usando el programa Vector NTI (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) y se analizaron utilizando el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) empleando como referencia la secuencia del transposón Tn1546 completo (numero de acceso de GenBank: M97297.1) y ISfinder para determinar las secuencias de inserción que se habían insertado en el esqueleto (backbone) del transposón.

#### 4.3.2. Determinación del tipo de transposón que contiene *vanB*

El tipo de transposón (Tn1549/Tn5382) en el que se encontraba contenido el elemento *vanB* se determinó mediante la comparación del perfil de restricción de los amplicones de ADN (fragmentos de 5.959 pb correspondientes a los elementos *vanRSYWHBX*) generado mediante las enzimas *Bsp*HI/*Dra*I con dos controles de estos transposones [258]. Para ello se amplificó, mediante una *long* PCR un fragmento de 5.959 pb empleando la enzima y condiciones descritas en el apartado 4.3.1. de este capítulo, pero empleando una  $T_m=59^\circ\text{C}$  y una fase de elongación de 7 min. Posteriormente se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  *o.n.*, 5  $\mu\text{l}$  de estos productos de PCR con una solución de digestión que contenía: 1  $\mu\text{l}$  de enzima *Dra*I, 1  $\mu\text{l}$  de enzima *Bsp*I (New England BioLabs Inc), 1  $\mu\text{l}$  de tampón y 3  $\mu\text{l}$  de agua estéril. El ADN procedente de los dos controles RFLP1 (*E. faecalis* V583 CDC) y RFLP2 (Tx2624/Tx2148) se amplificó y digirió de igual manera que el ADN problema. Los productos de la digestión se separaron mediante



electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. La visualización de los resultados se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.2.3. del capítulo I.

**Tabla 16.** Cebadores y condiciones empleados en la caracterización de la resistencia a vancomicina.

PCR	Gen	Tamaño (pb)	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Referencia
Detección de genotipo de resistencia/preparación de sondas para hibridación	<i>vanA</i>	732	EA1	GGGAAAACGACAATTGC	48	Depardieu y cols., 2004
			EA2	GTACAATGCGGCCGTTA		
	<i>vanB</i>	647	EB3	ACGGAATGGGAAGCCGA	50	
			EB4	TGCACCCGATTTCGTC		
Preparación de sondas para hibridación	<b>23S rDNA</b>	669	23S-F	CGCATGTACAGGATAGGTAGG	58	Dahl y cols. 2003
			23S-R	AGGTGGGCTTCAACATTAGAT		
Detección estructura transposón <i>Tn1546</i>	<b>ORF 1</b>	1308	P1	GGA TTT ACA ACG CTA AG	45	Woodford y cols., 1998
			P2	GCC TTT ATC AGA TGC TA		
	<b>ORF 1</b>	1131	P3	GGT TTT CGA TTA TTG GA		
			P4	AAA TAA TAG AAC GAC TC		
	<b>ORF 1/ ORF 2</b>	1298	P5	CGG AAT GCA TAC GGC TC		
			P6	AGC CAT ACA GTA ATT A		
	<b>ORF 2/ vanR</b>	1273	P7	GGA TGG ACT AAC ACC AA		
			P8	TTA AGT ATA ATT CAA CC		
	<b>ORF 2/ vanR</b>	1224	P9	GTG AAG GGA TTG AAT TG		
			P10	TCC AAT CCC CAA GTT TC		
	<i>vanS/vanH</i>	1678	P11	AAA CGA CTA TTC CAA AC		
			P12	CAT AGT ATA ATC GGC AA		
	<i>vanH/vanA</i>	1792	P13	GTG TGA AAT ATA TTT CT		
			P14	TTC CAT GCT TAT CAC CC		
	<i>vanA/vanX</i>	1941	P15	ATG AAT AGA ATA AAA GT		
			P16	GGA TTT ACT ATT ATC AC		
	<i>vanY/vanZ</i>	1594	P17	AAT TCA TCT ACA TTG GT		
			P18	TCA GTC CAA GAA AGC CT		
	<i>vanZ</i>	427	P19	TAT CTT CGC TAT TGG AG		
			P1	GGA TTT ACA ACG CTA AG		

#### 4.3.3. Transferibilidad de genes *vanA/vanB*

La capacidad de transferencia por conjugación de los genes *vanA/vanB* se determinó *in vitro* de la siguiente manera:

1. Se incubaron las cepas donadoras (cada uno de los aislados con un patrón de campo pulsado diferente) y la receptora (Ge1RF [259]) en 5 ml de BHI a 37°C sin agitación *o.n.*
2. Se mezclaron 500 µl de cada cepa donadora con 500 µl de la receptora en distintos tubos de eppendorfs y se centrifugaron a 4.000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente.
3. Se decantó el sobrenadante y se homogenizó el *pellet* en 100 µl de medio BHI.
4. Se depositó este volumen sobre filtros de nitrocelulosa colocados sobre placas de agar BHI y se incubaron las placas a 37 °C *o.n.* Los pasos 1-5 se repitieron para cada una de las cepas donadoras de manera independiente (sin mezclar con la receptora).
5. El día siguiente se desprendieron los filtros de las placas, se depositaron en tubos de plástico que contenían 1.000 µl de solución salina estéril 0,9% y se agitaron en un vórtex durante 2 min.
6. Se realizaron diluciones seriadas en base diez de las suspensiones anteriores ( $10^{-1}$  - $10^{-8}$ ) y se inocularon 25 µl de las suspensiones de células donadora-receptora en placas de BHI suplementadas con ácido fusídico (25 mg /L), rifampicina (30 mg/L) y vancomicina (6 mg/L).

Como control, se realizaron diluciones seriadas de las suspensiones que sólo contenían células donadoras y se depositaron sobre placas de BHI suplementadas con vancomicina (6 mg/L).

7. Todas las placas se incubaron a 37°C *o.n.* y al día siguiente se contaron el número de colonias crecidas en cada placa. La frecuencia de conjugación se calculó con la siguiente fórmula:  $FC = (UFC/ml\ TC)/(UFC/ml\ D)$ , siendo TC: cepa transconjugante; D: cepa donadora; UFC/ml: n° de UFCx factor de dilución.

## 5. Presencia de genes asociados a virulencia y bacteriocinas

La presencia de los genes asociados a virulencia *esp*, *hyl<sub>Efm</sub>* y *acm*; y de las bacteriocinas cromosómicas (*entA*, *entB*) o plasmídicas (*entP*, *entQ*, *bac43*, *bac32* y *entL50a/L50b*) se determinó mediante PCR simple siguiendo las indicaciones del apartado 7.1. y 7.2. del Capítulo I y los cebadores y Tm descritas en ese mismo capítulo.

## 6. Evaluación de la eficiencia de la transmisión dedo-dedo de *E. faecium*

### 6.1. Selección de aislados y participantes

Para estudiar la eficiencia de la transmisión bacteriana a través del contacto de la piel se seleccionó un grupo de voluntarios que se correspondían con personal del laboratorio de Microbiología. Ninguno de los participantes recibió ningún antibiótico en los 6 meses previos o durante el estudio, de manera tópica o sistémica, ni se empleó ninguna solución alcohólica o jabonosa al menos 90 min antes de realizar el experimento.

Como aislados bacterianos se emplearon dos cepas bien caracterizadas de *E. faecium*: 1) *E. faecium* L50 (ST178-CC94) productora de múltiples bacteriocinas, aislada de la piel de un chorizo [209] y 2) *E. faecium* aislada de colonización de un paciente hematológico (ST117, Capítulo I) y responsable de una epidemia en nuestro hospital.

### 6.2. Descripción del modelo de estudio

Los aislados se incubaron en 10 ml de BHI *o.n.* a 37°C y se diluyeron, tras medir la densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>), en solución salina estéril para obtener una concentración de 10<sup>7</sup> UFC/ml. Se depositó una alícuota de 10 µl del inóculo en la superficie de cada uno de los dedos pulgares (130 mm de diámetro, definido por cuatro marcas en la yema del dedo) de cada voluntario y se dejó secar completamente durante 5 min.

Para explorar la transmisión de bacterias entre dedos se puso en contacto durante 5 seg (asegurando el contacto total entre superficies, aplicando una mínima presión y evitando la formación de pliegues, superficie de muestreo: 0,78 cm<sup>2</sup>) la yema del dedo pulgar de una mano con el dedo índice de la mano contraria. A continuación, se repitió este mismo proceso con la yema de ese dedo índice y la del dedo corazón de la mano contraria. Por último, se puso en contacto la yema del dedo corazón de la primera mano con la del dedo anular de la segunda. El remanente bacteriano de cada yema se recogió en un tubo eppendorf con 750 µl de suero salino estéril. En la figura 33 se resume la metodología empleada.



Todas las soluciones salinas recuperadas de las yemas de los cuatro dedos se sembraron sobre medio m-Ent (la del primer dedo previa dilución 1:10) y se incubaron durante 48 h a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se contó el número de UFC en cada placa.



**Figura 33.** Esquema del estudio de la transmisión dedo-dedo.

Este mismo procedimiento se repitió para el segundo aislado, el mismo día, tras lavar las manos con jabón neutro y agua corriente y aplicar una solución alcohólica. Cada experimento se repitió semanalmente durante 8 semanas y los resultados se expresaron como el remanente de UFC en cada dedo tras cada contacto. La capacidad de transmisión de cada voluntario se clasificó en: 1) **baja**, cuando la disminución en el número de UFC entre el dedo pulgar y el anular fue  $\geq 2$  log, 2) **media**, cuando esta disminución estuvo comprendida entre 1-2 log y 3) **alta**, cuando la diferencia de recuentos entre estos dos dedos fue  $\leq 1$  log.

## RESULTADOS

### 1. Descripción del brote

Entre los meses de julio de 2015 y marzo de 2016 se realizaron un total de 10.155 cultivos de vigilancia epidemiológica en 6.630 pacientes y se detectó primo-colonización por EVR en 52 de ellos (0,5% de los cultivos, 0,78% de los pacientes). En todos los casos la especie aislada fue *E. faecium*.

Los pacientes fueron en su mayoría hombres (n=34, 65,3%) con una edad media de  $71,2 \pm 14,5$ . El tiempo medio transcurrido desde el ingreso hasta la detección de colonización fue de  $15 \pm 14$  días. Este dato, sin embargo, no es indicativo del tiempo de adquisición de colonización por EVR, ya que, y pese a tener implantado un sistema de vigilancia activa, no se realiza vigilancia universal de todos los pacientes cuando ingresan en una determinada unidad, con la excepción de las unidades de críticos (U.C.I médica, Unidad de críticos quirúrgicos, UCQ).

Durante este periodo se detectó EVR en tres muestras clínicas, dos de ellas en pacientes sin informes previos de colonización por EVR. La primera que aconteció en el tiempo fue una infección de tracto urinario (16 días tras ingreso) en una paciente que ingresó en cirugía de la columna por una estenosis vertebral en la que no se realizaron cultivos de vigilancia previos al aislamiento, por no encontrarse en una unidad de riesgo (de acuerdo a protocolos de vigilancia activa vigentes en el hospital) ni posteriores, al recibir el alta médica. El segundo caso se detectó tres meses después en un paciente hepatópata crónico con varios episodios de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa, en el que se aisló *E. faecium* resistente a glucopéptidos en un cultivo de una punta de catéter localizado en la vena subclavia (25 días tras ingreso). La detección de EVR en una punta de catéter en ausencia de hemocultivos positivos podría indicar colonización del catéter más que de una infección clínica propiamente dicha. El tercer caso se produjo en un paciente con un adenocarcinoma rectal en el que se detectó colonización intestinal por EVR 6 días antes del aislamiento de *E. faecium* resistente a glucopéptidos en un drenaje de un absceso sufrénico (24 días tras su ingreso).

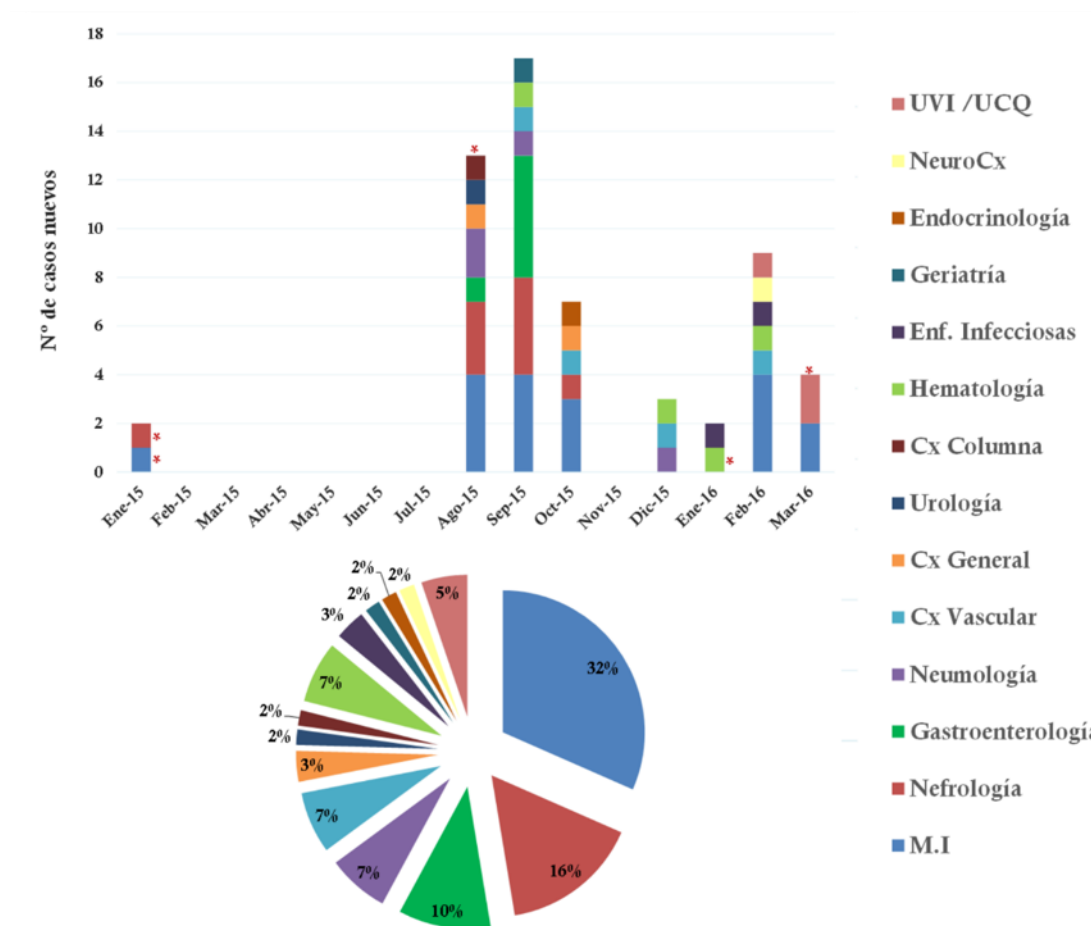
La revisión de los informes microbiológicos del año anterior permitió identificar como casos índice una peritonitis y una infección de piel y partes blandas en dos pacientes ingresados los Servicios de Nefrología y Medicina Interna, respectivamente durante el mes de enero de 2015. Aunque estos pacientes coincidieron temporalmente durante su ingreso hospitalario, no se encontró nexo de unión epidemiológico certero entre ambos.

La mayoría de los casos (65%), tanto de colonización como de infección, se concentraron entre los meses de agosto (13/57; 22,8%), septiembre (17/57; 29,8%) y octubre de 2015 (7/57; 12,3%) en los Servicios de Medicina Interna y Nefrología (figuras X y X1).

Como consecuencia de este hallazgo se implantaron una serie de medidas microbiológicas y preventivas. En el primer caso se incluyó el medio selectivo chromID VRE (BioMérieux) para el aislamiento de EVR en el cribado rutinario de portadores rectales. En cuanto a la prevención de la transmisión, se aplicaron **medidas de precaución estándar** (uso de guantes, bata, lavado e higiene de manos...) y **medidas de precaución** basadas en la **transmisión por contacto** (aislamiento en habitaciones individuales de todos los nuevos pacientes

colonizados/infectados por EVR, limpieza diaria de habitaciones con desinfectantes y restricción de visitas, entre otras).

La implantación de medidas de control de infección disminuyó notablemente el número de casos en las áreas afectadas, aunque con posterioridad han aparecido nuevos casos.



**Figura 34.** Distribución temporal y por servicio de los casos (colonización/infección) de EVR. Los asteriscos indican los aislamientos procedentes de muestras clínicas. Abreviaturas: UCQ, unidad de críticos quirúrgicos; Enf, enfermedades; Cx, cirugía; M.I, medicina interna.

## 2. Caracterización molecular del brote

### 2.1. Relación clonal de los aislados y características microbiológicas

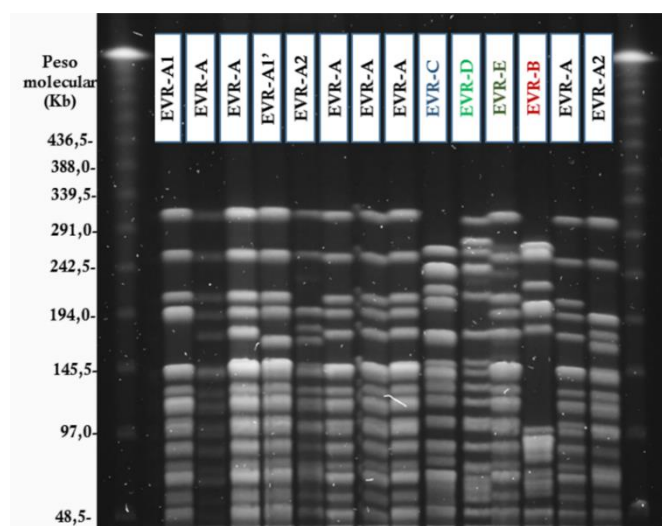
El análisis de los aislados de EVR mediante PFGE y MLST demostró que se trataba de un brote ya que el 92,9% (53/57) de los aislados pertenecieron a un mismo clon (EVR-A-ST17-BAPS 3.3a). De manera puntual se identificaron otros cuatro pulsotipos diferentes (EVR-B, EVR-C, EVR-D, EVR-E) (figura 35), todos ellos pertenecientes a la ST117 (BAPS 2.1a), pero diferentes al clon ST117-B que se identificó previamente en pacientes oncohematológicos de nuestro hospital durante el periodo 2009-2011.

Los genes asociados a virulencia *esp* y *acm* se detectaron en todos (57/57) o en la práctica totalidad de los aislados (55/57; 96,4%), respectivamente. Por el contrario, el gen *hyl* se detectó

en todos los aislados pertenecientes al clon EVR-ST117 y en un pequeño número de los aislados pertenecientes al clon epidémico EVR-ST17 (7/57; 12,3%).

Por otra parte, se observó la gran mayoría de aislados eran portadores de los genes que codifican para la enterocina A (*entA*) (52/57; 91,2%) y la bacteriocina 43 (*bac43*) (55/57; 96,4%). No se detectó la presencia de los genes *entB*, *entP*, *entQ*, *bac32* ni L50a/b en ninguno de estos aislados.

Los aislados fueron resistentes a ampicilina (>8 mg/L), levofloxacino (>4 mg/L), y presentaron alto nivel de resistencia a estreptomicina (>1000 mg/L). Además, todos presentaron altos niveles de resistencia a vancomicina (>256 mg/L) y teicoplanina (>8 mg/L) con la excepción de un aislado (CMI vancomicina: 4 mg/L; CMI teicoplanina: 0,5 mg/L). Únicamente un reducido número de aislados (5/57, 12,2%) exhibió además, alto nivel de resistencia a gentamicina (>500 mg/L). Todos los aislados fueron sensibles a linezolid.



**Figura 35.** PFGE-*SmaI* de algunos de los aislados de EVR detectados durante el brote. Los distintos clones detectados aparecen marcados con un color diferente. En el primer y último carril aparecen las bandas correspondientes al marcador lambda.

## 2.2. Caracterización molecular de la resistencia a glucopéptidos

La resistencia a glucopéptidos se asoció a la presencia del operón *vanA* salvo en un caso. El único aislado que presentó un genotipo de resistencia a glucopéptidos diferente fue un aislado de colonización de un paciente hematológico, en el que se detectó el gen *vanB* (EVR-D-ST117).

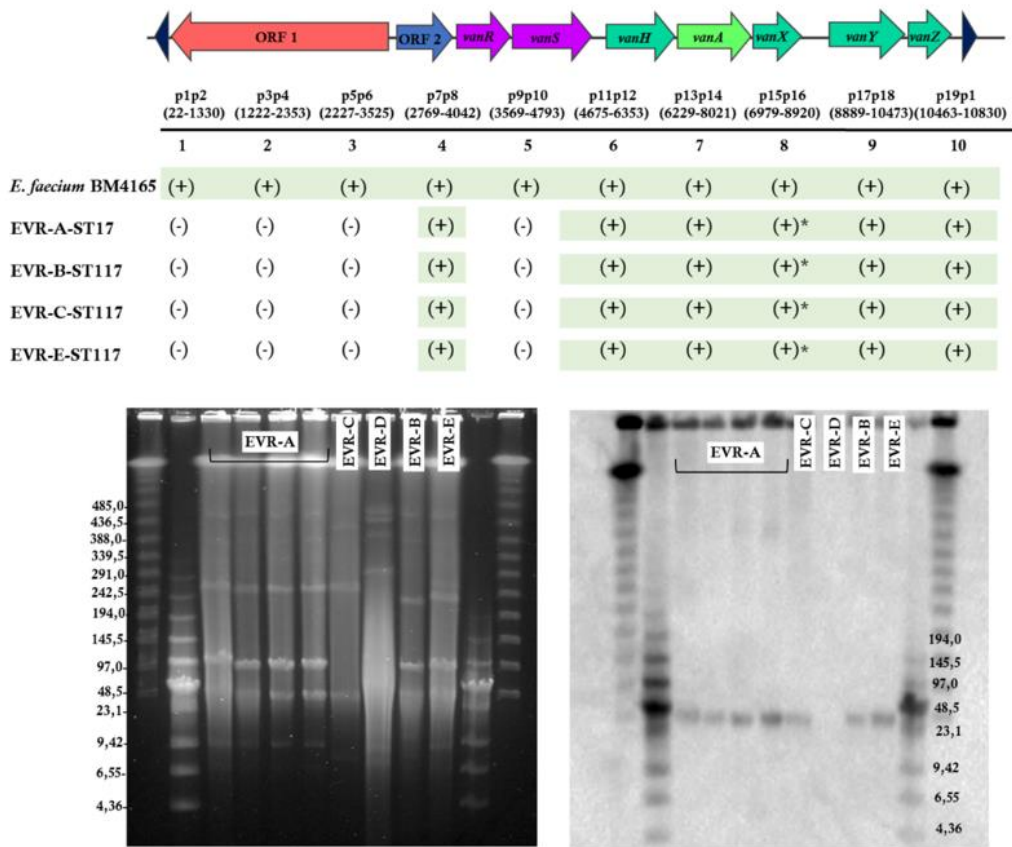
### 2.2.1. Caracterización de los transposones *van*

En las cepas con el genotipo *vanA* (EVR-A, EVR-B, EVR-C y EVR-E) se determinó la estructura del transposón Tn1546 mediante PCRs solapantes [257] y se comparó con el prototipo de *vanA*. Nuestras cepas presentaron una variante del transposón Tn1546, en el que el ORF1 estaba ausente y los fragmentos 5 (*vanS*) y 8 (*vanA* y *vanX*) no amplificaron. El empleo de los cebadores del fragmento anterior y del propio fragmento (p7/p12, fragmento 5 y p13/p16 para el fragmento 8) permitió amplificar el fragmento 8. Estos amplicones se secuenciaron y sobre esta secuencia se diseñó, mediante *primer walking*, una pareja de

cebadores para amplificar la región interna (**ISEfm-Fw**: ACG-AAA-TCT-GGT-GTA-TGG-AAA, e **ISEfm-Rv**: ATC-AGA-AAG-AAT-CGC-AAA-GTC-C). La secuenciación de estos fragmentos permitió identificar la secuencia de inserción ISEfa4 entre la región *vanA-vanX*.

La hibridación del ADN genómico digerido con *I-CeuI* con sondas específicas frente *vanA*, reveló que el gen *vanA*, incluido en el transposón Tn1546 estaba, en todos los casos, localizado en un plásmido de aproximadamente 50 Kb (figura 36), y no se consiguió transferir mediante conjugación a la cepa receptora *E. faecium* Ge1RF en las condiciones experimentales empleadas.

El clon EVR-D-ST117 fue el único en el que se detectó la presencia del genotipo *vanB*. El operón estuvo contenido en el transposón Tn5382/1549 (*vanB2*) que se localizó mediante *Southern blot* en el cromosoma bacteriano.

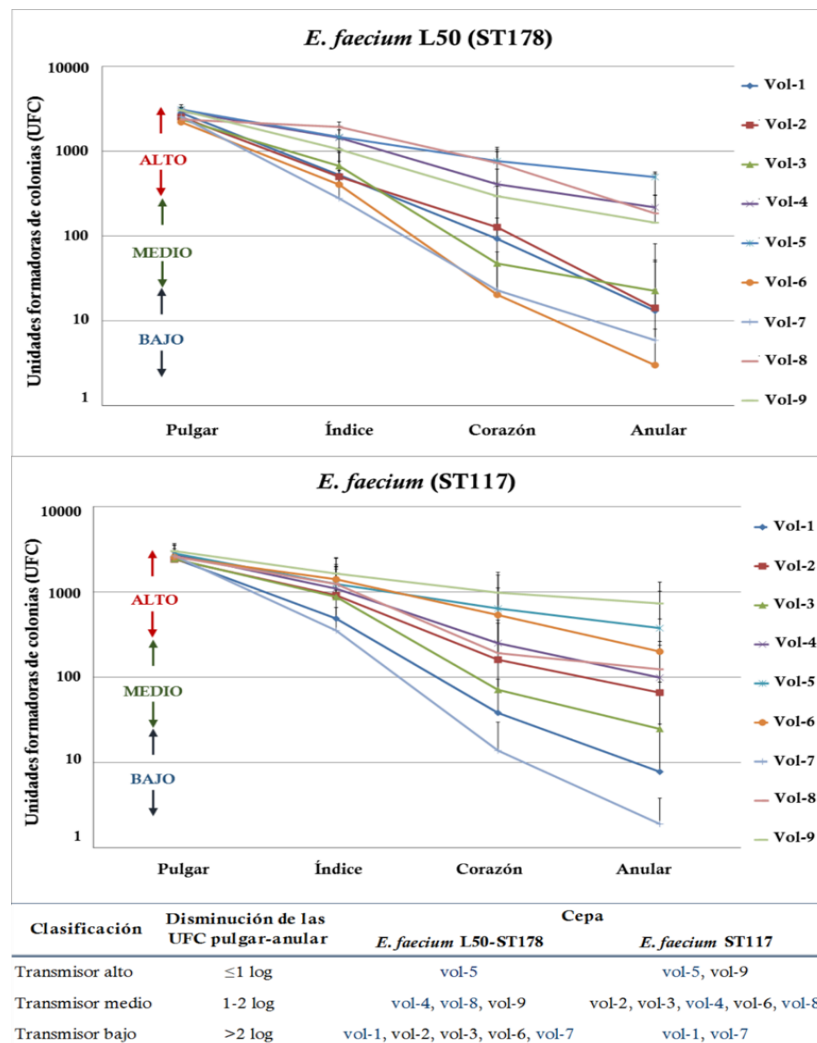


**Figura 36.** Estructura del transposón Tn1546 y localización del gen *vanA*. En la parte superior aparecen indicados como (+), los fragmentos del transposón que estaban presentes (amplificaron utilizando el esquema de Woodford [257]). Las figuras de la parte inferior se corresponden con el perfil de digestión PFGE-*S1* nucleasa y la hibridación de la membrana con la correspondiente sonda de *vanA* de 4 aislados distintos pertenecientes al clon EVR-A-ST117 y un representante del resto de clones (EVR-B, EVR-C y EVR-E).

### 3. Estudio de la transmisión dedo-dedo

Para este estudio se contó con 9 voluntarios, 6 mujeres y 3 hombres (vol-1, vol-4 y vol-5) con una edad media de 31 años, entre el personal de nuestro Servicio. El computo global de los experimentos demostró que la transmisión de los inóculos bacterianos dedo-dedo fue dependiente de la cepa de *E. faecium* y de cada voluntario. De manera general la cepa *E. faecium*-ST117 fue la cepa con mayor capacidad de transmisión para todos los voluntarios (basados en la ratio de caída del recuento bacteriano entre el primer y el último dedo) pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Basado en la disminución de los recuentos de UFC entre las yemas de los dedos pulgar y anular, los voluntarios se clasificaron en transmisores altos, medios o bajos según lo descrito en material y métodos (Figura x). Los voluntarios vol-1, vol-4, vol-5, vol-7 y vol-8 se clasificaron dentro de la misma categoría de transmisor con independencia de la cepa usada en el experimento, mientras que los otros 3 voluntarios variaron en función de la cepa. El número tan reducido de aislados y voluntarios impidió cualquier tipo de asociación entre el género y la capacidad de transmisión.



**Figura 37.** Eficiencia de la transmisión dedo-dedo. En el gráfico superior se esquematiza los perfiles de transmisión de las cepas *E. faecium* L50 y en la parte inferior, los de *E. faecium*-ST117.





## DISCUSIÓN

---





En los últimos 20 años, *E. faecium* ha pasado de ser considerado como un microorganismo inofensivo y comensal del TGI humano, para convertirse en uno de los principales responsables de infecciones nosocomiales. Los datos del último informe nacional de prevalencia de infección nosocomial (Estudio EPINE-EPPS 2016) lo sitúan en la séptima posición de los microorganismos causantes de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria. Los estudios moleculares de las poblaciones causantes de estas infecciones han permitido determinar que este cambio epidemiológico se debe a la emergencia de una subpoblación genética (clado A), diferente de las poblaciones habituales de la microbiota intestinal de personas sanas, y que además se asocia con resistencia adquirida a un elevado número de antibióticos (ampicilina, aminoglucósidos y en ocasiones vancomicina). De todas las infecciones en las que participa *E. faecium*, la bacteriemia es la que tiene un mayor impacto en la morbi-mortalidad del paciente, especialmente en pacientes con algún tipo de inmunosupresión. Este es el caso de los pacientes oncohematológicos neutrópenicos, en los que la bacteriemia representa un 25-30% de los episodios febriles y puede llegar a tener una mortalidad asociada entre el 5 y el 30% [260] .

Por este motivo, en el **primer capítulo** de esta Tesis nos planteamos el estudio de la dinámica de colonización intestinal de *E. faecium* con resistencia a ampicilina en un grupo de pacientes oncohematológicos con alta probabilidad de desarrollar neutropenia de alto riesgo. La resistencia a ampicilina se utilizó, en estos aislados de *E. faecium*, como marcador de clones de alto riesgo asociados al hospital, ya que actualmente la prevalencia de la resistencia a la vancomicina en los aislados clínicos de nuestro medio es muy baja.

La colonización del TGI y el posterior enriquecimiento de la población es una etapa crucial en la patogenicidad de *E. faecium*, y parece condicionar el desarrollo de bacteriemia [232,261]. En muchos casos, el TGI constituye la principal fuente de infección endógena [177], aunque existen pocos estudios que hayan evaluado de manera prospectiva la dinámica de colonización de *E. faecium* en pacientes oncohematológicos y su implicación con la infección. Además, los escasos estudios que existen se han realizado en EE.UU. donde la situación epidemiológica es muy diferente de la europea como ya se ha explicado previamente [262,263].

Durante el estudio prospectivo desarrollado en el primer capítulo de esta Tesis Doctoral observamos que cerca de dos tercios de los pacientes incluidos en el estudio estaban colonizados o se colonizaban en algún momento de su estancia hospitalaria por EfmRA. Además, la probabilidad de colonización por EfmRA aumentaba de manera proporcional al tiempo de ingreso del paciente, siendo máxima (la mitad de todos los pacientes del estudio) al finalizar la profilaxis extendida con levofloxacino, momento en el que muchos de ellos recibían tratamientos antibióticos de amplio espectro. Además de la colonización es importante, también, destacar la capacidad de persistencia de estas cepas. De hecho, en tres cuartas partes de los pacientes en los que se detectó colonización por EfmRA, se comprobó la persistencia de la colonización en el tiempo.

En un estudio publicado en 2012, Weisser y colaboradores [198] estudiaron la dinámica de colonización de *E. faecium* en pacientes del Servicio de Hematología y de la UCI de dos hospitales distintos, y encontraron que un alto porcentaje de pacientes se colonizaba por *E. faecium* durante el ingreso (67 y 92%, respectivamente), siendo estos aislados en su mayoría EfmRA (40 y 84%, respectivamente). Estas diferencias tan marcadas en las tasas de colonización por EfmRA podrían deberse a que 50% de los pacientes ingresados en la UCI había sido trasladados desde otro servicio del hospital, mientras que casi todos los pacientes hematológicos proveían de su domicilio. Sin embargo, este hecho también podría explicarse por otros factores como las estrictas medidas higiénicas empleadas en los Servicios de Hematología y el aislamiento de los pacientes en habitaciones individuales, o incluso a la distinta epidemiología de los dos centros. Curiosamente, mientras que la diversidad clonal de la población de *E. faecium* disminuyó durante el ingreso en pacientes hematológicos, por predominio de un clon epidémico, esta diversidad aumentó en la UCI, sugiriendo eventos de transmisión cruzada entre pacientes. Los datos obtenidos en este estudio son muy similares a los obtenidos en nuestro estudio en el que un número importante de pacientes hematológicos se colonizan por un clon epidémico de EfmRA. Las diferencias encontradas entre la tasa de colonización de los pacientes de nuestro estudio y los del estudio de Weisser (61% vs 40%) podrían deberse a que en más de la mitad de nuestros pacientes se documentó un ingreso previo en el mes anterior a su inclusión en el estudio. Weisser y colaboradores también pusieron de manifiesto el reemplazo de la población de *E. faecium* sensible a ampicilina por EfmRA cuando el paciente ingresaba en el hospital, y su descolonización tras recibir el alta. Además, en los pocos pacientes en los que persistió la colonización tras el alta, se pudo comprobar que el responsable era el clon de EfmRA epidémico de su área (MT159). Estos datos avalan la hipótesis de que los clones epidémicos son también más persistentes.

La colonización EfmRA asociada al ingreso en un hospital se ha descrito en otros estudios, principalmente realizados en UCIs aunque generalmente con un número muy inferior de pacientes [159,264,265]. Además, en estos estudios se aporta poca o nula información acerca de la estructura poblacional y los determinantes de virulencia de los aislados, lo que dificulta la comparación de los distintos escenarios epidemiológicos. A este inconveniente se le añade la consideración de que, hasta hace pocos años, todos los aislados de *E. faecium* asociados al hospital se agrupaban dentro de un gran complejo clonal, CC17, que parecía descender de un único fundador, el clon ST17. Recientemente, este gran complejo ha sido re-definido en tres linajes con orígenes evolutivos diferentes (ST17, ST18 y ST78) y en base a los grupos BAPS de análisis genético bayesiano de todas las secuencias disponibles de MLST [165,166]. En el trabajo de Tedim y cols., se analizó además la estructura poblacional aislados de muestras de pacientes hospitalizados (n=133) e individuos no hospitalizados (n=173), demostrando que más del 80% de los aislados se agrupan en los BAPS 1, 2 y 3. Adicionalmente, la tasa de colonización por EfmRA se asocia significativamente con los ingresos hospitalarios y la edad (en mayores de 60 años la colonización fue cuatro veces superior en pacientes hospitalizados que en no hospitalizados).

En nuestro trabajo, el estudio de la estructura poblacional de los aislados nos ha permitido comprender el proceso de colonización evidenciando que ocurre en un reducido número de clones (STs). Esta observación fue consistente con la baja diversidad detectada en la fase basal y su reducción durante las fases de profilaxis y post-profilaxis. La práctica totalidad de los aislados que detectamos pertenecieron a los grupos BAPS 2.2a y 3.3a, asociados significativamente a la colonización de pacientes hospitalizados [166], con un predominio casi exclusivo de los clones EfmRA-ST117 (mayoritariamente Esp<sub>Efm</sub> y Acm +) y EfmRA-ST17 (mayoritariamente Hyl<sub>Efm</sub> y Acm +). Estos clones que eran resistentes a levofloxacin, eritromicina y la gran mayoría, también a estreptomina (Ran-St), fueron capaces de colonizar y de persistir.

La persistencia de los clones EfmRA hospitalarios se ha descrito previamente [266,267], aunque aún se desconocen los factores moleculares que la justifican. Se ha postulado que la expresión de adhesinas u otros factores de virulencia como la proteína Esp<sub>Efm</sub>, o factores adaptativos (determinadas rutas metabólicas o bacteriocinas), pueda contribuir a la persistencia, tanto en el TGI como en el medio ambiente [38,43,56]. En base a estas hipótesis, decidimos investigar la presencia y producción de bacteriocinas, así como los perfiles de utilización de azúcares. La producción *in vitro* de bacteriocinas de nuestros aislados frente a la cepa *E. faecalis* JH2-2 fue muy heterogénea y no se detectó ninguna asociación con ningún clon. Sin embargo, todos los aislados productores de bacteriocinas, con la excepción de uno, se agruparon en los clones epidémicos EfmRA-ST117 y EfmRA-ST17. Esta diferencia en la producción de bacteriocinas dentro de aislados de un mismo clon podría deberse bien a la codificación plasmídica de las mismas, como se ha demostrado para algunas bacteriocinas de *E. faecium* (EntP, EntQ o EntL50); o bien a la dependencia de las condiciones de crecimiento para su expresión. Se ha demostrado que la producción de determinadas bacteriocinas por *E. faecium*, como la enterocina A, se ve favorecida en condiciones de estrés, como sucede cuando existe una tasa de crecimiento baja (por depleción de nutrientes o condiciones desfavorables), ya que en estas condiciones existe una mayor cantidad de aminoácidos disponibles para la síntesis de bacteriocinas [268].

Utilizando un representante de cada clon en base a los resultados de PFGE, observamos que sólo un 40% de nuestros aislados eran bacteriocinogénicos y que el 80% de ellos se agrupaban en los BAPS 2.1a y 3.3a. Además, la detección del gen *bac43* fue una característica común y única de estos clones. Como dato interesante, cabe destacar que el clon mayoritario EfmRA-ST117-B produjo una bacteriocina con capacidad de inhibir el crecimiento de práctica totalidad de clones, pero sin embargo fue resistente a las bacteriocinas de los otros clones. También nos llamó la atención el hecho de que este clon fuera el único con capacidad de metabolizar simultáneamente los polioles inositol, glicerol y sorbitol. Sin embargo, ya en 1995, Teixeira y cols. comunicaron la existencia de aislados clínicos de *E. faecium* con un perfil bioquímico diferente de la gran mayoría de aislados de esta especie: eran capaces de producir ácido a partir del glicerol, de la rafinosa y del sorbitol [269]. La capacidad de metabolizar sorbitol y glicerol es una característica habitual de *E. faecalis* pero no de *E. faecium*. Esta observación podría indicar la posibilidad de que este clon hubiera adquirido, por transferencia horizontal, los genes implicados en la metabolización de estos sustratos, como ya demostraron Zhang y cols. para los genes implicados en el metabolismo de la rafinosa, contenidos en megaplásmidos (150-300 kb). En la actualidad se ha encontrado en aislados de *E. faecium* un operón implicado en la metabolización del glicerol, análogo al de *E. faecalis* pero en el que un gen importante para la función del mismo, *gldA*, está ausente [5].

Hasta la fecha, no se han caracterizado las rutas metabólicas de *E. faecium*, pero se espera disponer en breve de esta información gracias al aumento del número de genomas secuenciados. Sin duda alguna, la adquisición horizontal de genes que permiten metabolizar sustratos podría ser uno de los múltiples factores que explicara el éxito ecológico de este clon en general, y en el TGI de pacientes oncohematológicos en particular.

Para profundizar en este proceso de colonización del TGI, seleccionamos un subgrupo de pacientes oncohematológicos en base a su estado de colonización por EfmRA, evaluando los cambios en su microbiota durante los periodos de PEL y Pos-PEL. Los resultados demostraron una importante reducción de la diversidad microbiana, que era evidente durante la fase de PEL y en muchos casos, todavía más pronunciada durante la Pos-PEL. Este hecho podría estar en relación con el efecto de la quimioterapia sobre las comunidades microbianas intestinales, además del efecto bactericida del levofloxacino. Curiosamente, mientras que la microbiota se redujo en cantidad y se empobreció en diversidad, la densidad de la población de enterococos aumentó considerablemente, coincidiendo con el aumento de la detección relativa de *E. faecium*. De acuerdo con nuestros resultados, Vliet y cols. observaron que las heces de pacientes pediátricos con LMA recogidas durante la administración de quimioterapia tenían recuentos bacterianos hasta 100 veces menores que en las procedentes de voluntarios sanos. Este descenso podría ser el resultado de una disminución de las bacterias anaerobias de hasta 10.000 veces, que se compensaba con un incremento de 100 veces en la población de enterococos con potencial patógeno [270]. Estos resultados ponen de manifiesto la pérdida de la barrera habitual de defensa frente a la colonización en pacientes tratados con quimioterapia, debido principalmente a un descenso en el número de bacterias anaerobias. Estos autores demostraron además que el uso profiláctico y terapéutico de antibióticos no era suficiente para explicar los cambios tan inmensos que tenían lugar en la composición de la microbiota y demostraron, mediante una serie de experimentos *in vitro*, que la quimioterapia presenta un efecto bacteriostático directo.

Otros autores también han demostrado el enriquecimiento de enterococos en el TGI de pacientes hospitalizados, y este hecho parece ser un factor crucial para la translocación bacteriana y el posterior desarrollo de bacteriemia [271,272]. Taur y cols. observaron que en los pacientes sometidos a TPH el predominio de EVR a nivel intestinal ocurría con frecuencia y que éste hecho incrementaba hasta 9 veces el riesgo de sufrir bacteriemia por EVR [232]. Aunque los resultados obtenidos por cultivo se correspondieron en la mayoría de los casos con los obtenidos mediante qPCR, nuestra aproximación al estudio de la evolución de la microbiota tiene dos limitaciones principales: 1) la detección de ADN bacteriano en las heces de los pacientes puede no ser indicativo de la viabilidad de estas bacterias y podría conducir a resultados erróneos en los que se sobreestiman algunos grupos bacterianos y 2) no utilizamos un gen específico para EfmRA sino que seleccionamos el gen *housekeeping* de *E. faecium*, *ddl*, como marcador subrogado. De esta forma podríamos estar sobreestimando la cantidad de EfmRA, aunque el desplazamiento de las poblaciones sensibles de enterococos por otras poblaciones resistentes a los antibióticos ha sido también descrito por otros autores [198,261,271].

Pese a estas limitaciones y considerando nuestros datos y los previamente publicados en la literatura, proponemos el siguiente modelo de colonización del TGI de estos pacientes: la administración de quimioterapia intensiva tiene un efecto inhibitorio y reductor sobre la microbiota intestinal, principalmente sobre las bacterias anaerobias. En un nicho ecológico altamente alterado, la presión selectiva ejercida en el TGI, por la PEL en un primer momento y, por los antibióticos de amplio espectro durante la neutropenia febril, pueden contribuir a la selección de EfmRA. Adicionalmente, los factores putativos de virulencia, bacteriocinas y otros factores adaptativos contribuirían a su sobrecrecimiento y persistencia durante las fases de PEL y Pos-PEL.

Aunque podríamos hipotetizar que uno de los principales agentes selectores de EfmRA es el levofloxacin y otros antibióticos de amplio espectro, en nuestro estudio la duración de la PEL y la administración de un determinado tipo de antibiótico no se asociaron significativamente con la colonización por EfmRA. Además y al contrario de lo que ha sido previamente publicado, la ausencia de un grupo control sin PEL y el relativamente bajo número de pacientes nos impidieron establecer diferencias en las tasas de colonización por levofloxacin [273]. Por el contrario, si pudimos asociar significativamente la fase de quimioterapia, la mucositis y la duración de la neutropenia con una mayor colonización por EfmRA. No obstante, debido al reducido número de pacientes no se pudo un realizar análisis multivariable.

Durante el estudio de colonización, se observó la emergencia de resistencia a linezolid en el clon epidémico EfmRA-ST117-N, tras la administración por vía oral de este antibiótico por un episodio de bacteriemia por EfmRA. También observamos que este clon resistente a linezolid era capaz de persistir largo tiempo en el TGI del paciente, incluso tras la interrupción del tratamiento. Este acontecimiento, junto con la dinámica de la microbiota, demuestra una vez más el importante papel ecológico y selector de los antibióticos. Existen numerosas referencias en la literatura sobre la emergencia de resistencia a linezolid en enterococos [97,98,149,205,274], principalmente tras la administración de tratamientos de larga duración. El principal mecanismo de resistencia son las mutaciones puntuales en genes que codifican para el dominio V de la subunidad 23S rARN, principalmente G2546T. Otro mecanismo menos frecuente es la metilación del residuo de adenina en la posición 2503 del gen 23S rARN por una metilasa codificada por el gen *cfr*. Nuestros aislados eran portadores de la mutación G2576T en una proporción 1:2, lo que en *E. faecium* parece sugerir la existencia de la mutación en 4 de los 6 alelos que tiene del gen 23S rARN. Aunque se ha demostrado que la mutación de un único alelo es suficiente para conferir resistencia, algunos trabajos han correlacionado el número de alelos mutados con mayores valores de CMI a este antibiótico [98].

En enterococos la tasa de mutación espontánea en los genes responsables de resistencia a linezolid es baja ( $10^{-9}$ - $10^{-11}$ ), pero una vez que se produce y se expresa, la presión selectiva ejercida a nivel intestinal podría seleccionar estos mutantes. De hecho, el levofloxacin junto con los antibióticos administrados durante la neutropenia febril (piperacilina-tazobactam y vancomicina) podrían haber contribuido al enriquecimiento de la población de EfmRA en el TGI de este paciente, como también habíamos detectado por qPCR (p19). Aunque la eliminación de linezolid se produce preferentemente en la orina, y sólo una pequeña cantidad se excreta en forma de metabolitos inactivos en las heces, se han detectado concentraciones bajas en heces de voluntarios sanos, asociado a una marcada reducción en la población de enterococos y otras especies como *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp. o *Bacteroides* spp [275]. Este hallazgo sustenta la hipótesis de que una pequeña cantidad de linezolid en el TGI podría ser suficiente para seleccionar mutantes resistentes y eliminar la población sensible.

El hecho de que los aislados con resistencia a linezolid presentara el mismo patrón de PFGE que los restantes EfmRA-ST117 y la ausencia de otros aislados resistentes, apoya la hipótesis de que la resistencia se desarrolló dentro del TGI, aunque en ningún momento se puede descartar la adquisición exógena. Desde luego, el TGI de los pacientes puede representar un importante reservorio de EfmRA con resistencia a linezolid, particularmente en hospitales con un alto consumo de este antibiótico. Adicionalmente, y aunque nosotros no lo observamos, la colonización persistente por EfmRA con resistencia a linezolid podría ser un riesgo importante en pacientes oncohematológicos, ya que son más propensos a desarrollar bacteriemia y otras infecciones como consecuencia de la neutropenia y la mucositis inducida por la quimioterapia.

La bacteriemia sigue siendo una de las complicaciones principales en los pacientes oncohematológicos neutropénicos y su etiología ha cambiado sustancialmente en los últimos años. Cuando la quimioterapia comenzó a utilizarse de manera generalizada en el tratamiento del cáncer, los bacilos gramnegativos constituían la principal causa de infección (mediados de los 80) [260,276,277]. Sin embargo, en las últimas tres décadas ha aumentado la proporción de bacteriemias debidas a microorganismos grampositivos, principalmente estafilococos coagulasa negativos, estreptococos y enterococos [175,176,195,276]. Los principales factores que parecen determinar esta inversión de la balanza a favor de los grampositivos son el uso generalizado de catéteres permanentes y la profilaxis antibiótica con fluoroquinolonas [276]. El empleo de quinolonas de forma profiláctica ha demostrado ser especialmente eficaz en la reducción de la mortalidad y del número de bacteriemias por microorganismos gramnegativos [191], pero por otra parte también se ha asociado a un aumento de la resistencia a diversos antibióticos [278–280]. Pese a la cantidad de estudios publicados que evidencian esta asociación, las principales sociedades de enfermedades infecciosas y cáncer (*Infectious disease society of America*, IDSA; *European society for medical oncology*, ESMO o la *American society of clinical oncology*, ASCO) todavía recomiendan la profilaxis antibiótica con fluoroquinolonas en pacientes oncológicos [281]. Algunos hospitales han dejado de administrar esta profilaxis a los pacientes oncohematológicos [197], y en otros donde las tasas de resistencia a quinolonas son de manera basal muy altas, se desaconseja abiertamente su uso [282].

El incremento de las bacteriemias por grampositivos en los pacientes hematológicos se corresponde en parte con el aumento de los episodios causados por enterococos. Este aumento se viene documentando desde principios de los años 2000 pero es especialmente evidente en la actualidad [120,128,195,199,283,284]. En 2013 Gudiol y cols. publicaron un trabajo en el que notificaban el aumento de bacteriemias por EfmRA y su predominio frente a las producidas por *E. faecalis* en pacientes con cáncer durante los años 2006 y 2012 [195]. De manera paralela, en el Hospital Ramón y Cajal, se ha registrado un aumento de bacteriemias enterocócicas desde un 2,3‰ en el año 1996 a un 3,0‰ en el año 2014. Además, de manera similar a lo observado por Gudiol y cols., este aumento ha coincidido con la disminución de la ratio *E. faecalis*/*E. faecium* (de 5:1 en 1996 a 1:1 en 2014), además del aumento significativo de cepas resistentes a ampicilina (>90% en 2013). Estos aislados de EfmRA fueron también resistentes a levofloxacino, eritromicina y presentaron alto nivel de resistencia a estreptomina [199]. En cuanto a la estructura poblacional de estos aislados de EfmRA en nuestro hospital, Tedim y cols. demostraron, como habían observado previamente en los aislados de colonización, un predominio de los grupos BAPS 2 y BAPS 3, agrupándose la mayoría en el subgrupo 3.3a.



En nuestro estudio, los microorganismos grampositivos constituyeron la primera causa de bacteriemia en pacientes oncohematológicos, ocupando EfmRA el tercer lugar (7,7% del total de pacientes), por detrás de los estafilococos coagulasa negativos y de *E. coli*. En todos los casos, la bacteriemia se detectó en pacientes con LMA tras la administración de quimioterapia de inducción a la remisión. Todos pacientes presentaban colonización por EfmRA, siendo el clon EfmRA-ST117-B (BAPS 2.1a) detectado en sangre idéntico al del TGI. Este hecho podría indicar varias cosas: 1) que este clon tiene una mayor capacidad de colonización y que ante una barrera intestinal alterada sería capaz de translocar y acceder a sangre o 2) que este clon, además de colonizar el TGI tuviera alguna característica intrínseca que le permitiera translocar más eficientemente o 3) ambas cosas. La dominancia de este clon en todos los episodios de bacteriemia de nuestro hospital a partir del año 2009 parecen avalar el segundo punto [199].

Se han publicado muchos trabajos evaluando los factores que condicionan la bacteriemia enterocócica y en la mayoría se han encontrado como factores de riesgo independientes el tratamiento antibiótico previo, la presencia de cánceres hematológicos, inmunosupresión o mucositis o la presencia de una sonda urinaria, entre otros [141,197,284]. En un estudio realizado en Japón en 2011 por Chong y cols. Se evaluó el efecto de interrumpir la PEL en el perfil etiológico de las bacteriemias en dos periodos, uno con profilaxis antibiótica y otro sin ella [285]. Aunque no observaron diferencias significativas, sí que observaron un aumento en la detección de *Enterococcus* durante el periodo de administración de PEL. Esto podría sugerir que la profilaxis con quinolonas pudiera ser un factor de selección de enterococos resistentes a nivel intestinal, como se ha demostrado en otros estudios, que eventualmente podrían originar bacteriemia en pacientes oncohematológicos.

Todas estas observaciones recalcan la importancia de la epidemiología local y la estructura poblacional de *E. faecium* para predecir las características de los clones que más frecuentemente originan bacteriemias y su perfil de sensibilidad antibiótica. De hecho, es importante que las guías farmacoterapéuticas del hospital contemplen estos datos a la hora de sugerir un determinado tratamiento empírico para el tratamiento de la neutropenia febril.

Durante mucho tiempo el PFGE se ha considerado la técnica de referencia para la tipificación molecular y el estudio de la estructura poblacional de *E. faecium*. Sin embargo, esta técnica no está exenta de inconvenientes como su elevado coste y tiempo, o la falta de estandarización a la hora de comparar los perfiles electroforéticos entre laboratorios. Por este motivo y pese al auge actual de las técnicas genómicas, quisimos determinar la utilidad del método de tipificación fenotípico PhP, desarrollado en Suecia por el grupo de la Dra. Kuhn [119,286]. Esta técnica permite la tipificación de un alto número de aislados con un coste e inversión de tiempo mínimos y podría ser útil en la caracterización de brotes dentro de una institución. Uno de los principales inconvenientes de las herramientas de tipado basadas en el fenotipo es la subjetividad en la interpretación de los resultados obtenidos ya que, cambios en la duración de incubación o en el tamaño del inóculo pueden hacer variar significativamente los resultados. Además, el resultado es la expresión de un genotipo y puede o no puede reflejar el estado actual de relación genética entre un grupo de aislados. La técnica PhP, a diferencia de otros sistemas basados en el uso de reacciones bioquímicas para el tipado bacteriano (ej: API, biolog), se basa en la evaluación cuantitativa de un conjunto de reacciones bioquímicas altamente discriminatorias. La obtención de una huella bioquímica de un aislado se basa en la medida de la tasa de metabolización de un sustrato mediante un sistema óptico en distintos momentos durante la incubación, lo que elimina los problemas asociados con interpretaciones



absolutas de 'positivo' o 'negativo'. Este sistema se ha empleado en numerosos trabajos de grupos de investigación [119,287,288] y previamente se ha demostrado que la elección de un correcto índice de similitud podría determinar el que esta técnica pudiese ser una herramienta útil en el tipado de grandes colecciones de enterococos.

Cuando comparamos el PhP frente al PFGE para nuestra colección de aislados encontramos poca correlación cuando se emplearon niveles de similitud muy altos (0,975 y 0,95), que hacían que la técnica fuera demasiado discriminatoria. Por el contrario, cuando se redujo el índice de similitud a 0,9 se detectó una buena concordancia ( $\kappa=0,6$ ). Saeedi y cols. también observaron un mayor acuerdo entre ambas técnicas con un nivel de similitud de 0,9 [287] aunque no obtuvieron una buena concordancia entre ambas técnicas. Una de las limitaciones principales del estudio de Saeedi y cols. es que no calculan el efecto del azar en la probabilidad del acuerdo y se limitan a dar un valor de concordancia basado en lo observado. Hasta la fecha la técnica de PhP ha demostrado buena concordancia con los resultados del PFGE en aislados de *E. faecalis* procedentes tanto de muestras clínicas [287] como otros ambientales [286] y en base a esto se ha empleado en varios estudios de aislados medioambientales a gran escala [288]. Sin embargo, los datos disponibles para la tipificación de *E. faecium* son escasos. En base a los resultados de nuestra comparación y conociendo las limitaciones que tiene esta técnica fenotípica, podríamos recomendar su utilización en laboratorios con recursos limitados o donde no existe la posibilidad de utilizar técnicas más robustas como el PFGE, MLVA o MLST, empleando siempre un índice de similitud de 0,9.

En el **capítulo II** de esta Tesis Doctoral se ha pretendido profundizar en el conocimiento de las infecciones invasivas enterocócicas y estreptocócicas como procesos complejos y multifactoriales en los que interactúan tanto el sistema inmune del huésped como la virulencia bacteriana. La mayoría de estas infecciones tienen un origen endógeno en el lumen intestinal, desde donde las bacterias atraviesan el epitelio intestinal por un proceso de translocación. Este fenómeno, que ocurre naturalmente en individuos sanos en una proporción variable (5-10%), puede verse incrementado en condiciones patológicas tales como la lesión isquémica, dismotilidad que conduce al sobrecrecimiento bacteriano y estados de inmunosupresión sistémica. En condiciones normales, las bacterias que traslocan son fagocitadas por las células del sistema inmune antes de que puedan acceder a la circulación sanguínea, evitando así el proceso bacteriémico. A pesar de la cantidad de estudios dedicados a caracterizar la translocación intestinal en bacterias gramnegativas, especialmente en *E. coli*, la información sobre este proceso en bacterias grampositivas es muy escasa. Un estudio reciente demostró que los enterococos resistentes a la vancomicina podían traslocarse al mismo nivel que cepas de *E. coli* productoras de beta-lactamasa de amplio espectro (*E. coli*-BLEE) [182]. Las bacterias grampositivas como *E. faecium* y *S. gallolyticus* representan dos de las principales especies con capacidad de translocación intestinal [233,289], aunque sus implicaciones clínicas difieren entre sí. *E. faecium* es una causa frecuente de bacteriemia, particularmente en pacientes oncohematológicos, como se ha demostrado en el Capítulo I; mientras que *S. gallolyticus* es uno de los agentes etiológicos de la endocarditis infecciosa, que suele asociarse con cáncer colorrectal. En base a estas observaciones, decidimos explorar las diferencias entre ambas especies en cuanto a su capacidad de translocar, ya que este proceso podría estar relacionado con la oportunidad de atravesar una barrera no preservada, como ocurre con *S. gallolyticus* durante el cáncer colorrectal [289].

Nuestros resultados demostraron que *E. faecium* tiene una capacidad de translocación muy superior a la exhibida por *S. gallolyticus*, con independencia de la procedencia de los aislados de *E. faecium*. Los clones de alto riesgo Efm106 y Efm121 aislados de muestras de heces y sangre de los pacientes hematológicos del primer capítulo, translocaron significativamente más que el aislado Efm 222, procedente de un individuo no hospitalizado. Estos resultados demuestran que existir diferencias intra-clonales que justificarían porqué los clones asociados al hospital originan bacteriemias con más frecuencia. La administración de quimioterapia altera profundamente la estructura de las membranas mucosas intestinales, induciendo una atrofia celular que se acompaña de un aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal [290]. La aparición de mucositis podría explicar parcialmente la frecuencia tan elevada de bacteriemias que se producen en los pacientes oncohematológicos [195]. Además, en estos pacientes, la administración de múltiples tratamientos antibióticos, como quinolonas o cefalosporinas de tercera generación, contribuye al enriquecimiento de las especies resistentes dentro del TGI, particularmente *E. faecium*, como se ha explicado previamente [261].

En nuestro modelo, *E. faecium* indujo una disminución de los valores TER inferior a la de las células de control (sin estímulo bacteriano), lo que sugiere una desestabilización del epitelio. Se ha demostrado que la monitorización de los valores de TER permite inferir la integridad de las uniones estrechas en cultivos en monocapas de células endoteliales y epiteliales. Por lo tanto, los cambios en los valores de TER se pueden relacionar con la integridad/funcionalidad de la barrera oclusiva paracelular [291]. El aumento en el valor TER junto con la disminución de la tasa de translocación de *E. faecium*, apuntan a la ruta paracelular como la principal vía de translocación para esta especie. Sin embargo, se requieren otras determinaciones adicionales para poder cuantificar la expresión y la localización de los componentes principales de las uniones estrechas, la proteína, ZO-1, durante y después de la exposición bacteriana. Por el contrario, las monocapas de células Caco-2 reaccionaron a los estímulos de *Lactobacillus* y *S. gallolyticus* aumentando los valores de TER, lo que podría estar relacionado con un posible efecto probiótico, tal y como se ha comunicado anteriormente [292].

*S. gallolyticus* es un microorganismo comensal del TGI humano y animal aunque las tasas de colonización de voluntarios adultos sanos (5-10%) es muy inferior a la que se ha encontrado en los rumiantes [34]. En nuestro trabajo, todos los aislados de *S. gallolyticus*, excepto la cepa Sg78, resistente a vancomicina, mostraron una baja adhesividad y ausencia de invasión de las células intestinales. Boleij y cols. obtuvieron resultados similares a los nuestros (tasas de invasión <0,02%) cuando emplearon dos líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano diferentes (Caco-2 y T-29) [13]. Sin embargo, otros autores han comunicado tasas de invasión superiores (0,1-10%) cuando los ensayos se realizaron en líneas celulares endoteliales primarias (HUVEC o EA.hy926) [293] lo que podría indicar que estos procesos puedan ser dependientes de los receptores que expresen estas células en su membrana celular.

El aislado de *S. gallolyticus* Sg78, en el que previamente se había detectado resistencia a vancomicina por la inserción del Tn1546, demostró ser el aislado con mayor capacidad invasiva [294], aunque no pudimos demostrar ninguna relación entre ambos factores.

Desde hace algo más de una década se ha incidido en el papel que pueden desempeñar los componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de la matriz extracelular (MSCRAMM) en el proceso de adhesión celular de *E. faecium* y *S. gallolyticus* [238]. Estos componentes son, en su mayoría, proteínas de superficie que median la unión entre la bacteria a distintos tejidos y se ha postulado que las variaciones en la expresión de estos componentes pudieran modular el proceso de translocación y ser responsable de las diferencias de translocación. En *Enterococcus* spp., una de las proteínas que mejor se ha caracterizado es la proteína de superficie enterocócica Esp, habitualmente localizada en una isla de patogenicidad. En modelos experimentales de infección urinaria por *E. faecium*, Esp se ha relacionado con la adhesión inicial al poliestireno y a la producción de biopelículas [240]. Además, es un importante marcador en las cepas epidémicas, como es el caso de cuatro de nuestros aislamientos, ya que su presencia parece limitarse a los clones de *E. faecium* adquiridos en el hospital. En nuestra experiencia, los aislamientos Esp+ fueron los más adhesivos, mientras que, al igual que los aislados Esp-, su capacidad de invasión fue muy reducida.

No se conocen los factores que condicionan la virulencia de *S. gallolyticus*, aunque recientemente se han descrito islas de patogenicidad y el locus *pil1*. En este locus están codificadas dos proteínas LPXTG (Gallo2178 y Gallo2179) y la sortasa C (Gallo2177), que han demostrado ser esenciales para la adhesión al colágeno I, y que en modelos murinos intervienen en los procesos de colonización y establecimiento de la endocarditis infecciosa [237]. En nuestro modelo, tres de las cuatro cepas de *S. gallolyticus* presentaron *pil1* y aunque no observamos una mayor adhesión a células Caco-2 si que se demostró una alta adhesión y capacidad de formación de biopelículas sobre colágeno I. El aislado Sg78 que carece de este operón fue el más adherente e invasivo. La presencia de determinantes virulentos no siempre está vinculada con su expresión *in vivo*, existiendo la posibilidad de una regulación negativa o simplemente la falta de expresión.

La principal limitación de nuestro estudio es el bajo número de cepas, que no nos permiten comparar las capacidades de translocación, adherencia e invasión y las particularidades intraespecíficas. Sin embargo, la compleja metodología de los experimentos también limita el número de cepas a estudiar, y por ello nos centramos en comparar según el origen de las cepas. La formación de biopelículas es también un factor de virulencia y de resistencia a los antibióticos que se ha relacionado con la colonización de dispositivos médicos (catéteres, válvulas cardíacas protésicas o aparatos ortopédicos), y que se asocia, entre otros, con la endocarditis de válvula nativa. La gran capacidad de *S. gallolyticus* para producir biopelículas sobre superficies ricas en colágeno ya ha sido previamente descrita, particularmente en superficies revestidas con colágeno I y IV [230]. En general, y al igual que lo que encontramos en nuestro trabajo, los aislados de *E. faecium* producen biopelículas en menor medida que *E. faecalis*, aunque se ha demostrado una mayor producción en aislados clínicos [241]. Las diferencias en la producción de biopelículas podrían deberse también a la ausencia de carbohidratos adicionales en el medio de cultivo empleado [38].

En nuestro Hospital durante el período 2005-2014, *E. faecium* causó dos veces más bacteriemias que endocarditis (0,02 vs 0,01%), mientras que para *S. gallolyticus* fue lo contrario, se detectó ocho veces más causando endocarditis que bacteriemia (0,04 vs 0,005%). Los principales resultados de nuestro trabajo podrían explicar estas diferencias clínicas inter-especies: *S. gallolyticus* forma más biofilm favoreciendo el establecimiento de vegetación endocarditis, mientras que *E. faecium* es más invasivo en relación a la bacteriemia. En resumen, y a pesar de las altas similitudes genéticas y bioquímicas de ambas especies, los resultados

obtenidos en este trabajo ponen de relieve sus diferencias en la capacidad de translocación intestinal.

En el **tercer capítulo** de esta Tesis, nos propusimos investigar las causas del aumento de la detección de EfVR en muestras de colonización rectal de pacientes ingresados en nuestro Hospital, a la vez que evaluar un modelo para el estudio de la dinámica de transmisión de bacterias entre personas a través del contacto de la piel.

La detección del brote causado por EfRV fue posible, gracias a la existencia de un sistema de vigilancia activo para la detección de microorganismos multirresistentes entre los que se incluyen las enterobacterias productoras de BLEE/carbapenemasas o multirresistentes, *Pseudomonas aeruginosa* productora de carbapenemasas o multirresistente, *Acinetobacter baumannii* multirresistente, *Staphylococcus aureus* meticilin-resistente y enterococos resistentes a los glucopéptidos. Todos los Servicios Clínicos y Quirúrgicos de nuestro Hospital participan activamente en este sistema, aunque los directamente implicados son los Servicios de Microbiología, Enfermedades Infecciosas y Medicina Preventiva, que además actúa como coordinador. Sin embargo, en la actualidad las guías no recomiendan el cribado de portadores de EVR en zonas de baja prevalencia, salvo en pacientes de alto riesgo (UCIs, trasplantados, pacientes oncohematológicos...). En nuestro país y hasta el año 2015, la prevalencia de EfVR en aislados clínicos era del 1-1,5%, pero en el último informe del EARS-Net demuestran que se ha producido un aumento del 1% con respecto a años anteriores (Informe EARS-Net, 2016). Esta situación epidemiológica también se ha observado en otros países europeos, aunque es mucho más grave en los países del este (Hungría, Eslovaquia, Rumania o Croacia entre otros) donde la prevalencia se sitúa en 14-25% (Informe EARS-Net 2016).

Durante los últimos años se han notificado brotes por EVR principalmente causados por la diseminación de *E. faecium*-VanA y en menor medida por cepas con el genotipo VanB. En su mayoría se han producido en pacientes de alto riesgo de Nefrología, Oncología, Hematología o UCIs [295–300]. De manera semejante a lo descrito por otros autores, las dos terceras partes de nuestros casos se agruparon en los Servicios de Medicina Interna y Nefrología, los dos servicios donde se detectaron los probables casos índice seis meses antes del descubrimiento del brote. La confirmación de que se trataba de un brote se produjo al comprobar que más del 90% de los aislados pertenecían a un mismo patrón de PFGE, el clon EfVR-ST17-A. Aunque una de las infecciones consideradas como caso índice (peritonitis) se produjo unos días antes de la detección de la infección de piel y partes blandas, no podemos saber con certeza cuál de estos dos pacientes introdujo el clon de EVR en el hospital o si por el contrario la resistencia a vancomicina fue adquirida por transferencia horizontal.

Inicialmente el brote se circunscribió al clon mayoritario EfVR-ST17, pero más tarde se pudo evidenciar una situación policlonal en la que predominaron distintas variantes del clon ST117, prevalente en los pacientes oncohematológicos de nuestro hospital. Esta diversificación, detectada a los dos meses de la declaración del brote, no se acompañó de un aumento en el número de casos debidos a estas nuevas variantes. La evolución de una situación monoclonal a una policlonal, se ha descrito con frecuencia en la literatura en instituciones donde inicialmente no se consigue controlar el brote y se establece una situación endémica. Varios trabajos han demostrado que la mayoría de los pacientes colonizados por EVR no desarrollan infecciones por este microorganismo, ya que, aunque la colonización suele preceder a la infección, la proporción de la relación entre ambas se ha estimado en 10:1 [118]. Sin embargo, como se ha comentado previamente, Taur y cols. demostraron que el

enriquecimiento intestinal en EVR puede aumentar hasta 9 veces el riesgo de sufrir bacteriemia [232]. Se han descrito muchos factores de riesgo de la colonización e infección por EVR, principalmente la administración de cefalosporinas de tercera generación y otros antibióticos con actividad antianaeróbica, la edad avanzada, las enfermedades oncohematológicas y otras como la cirrosis, la diálisis, la cirugía intrabdominal reciente o los ingresos prolongados[262,263]. La mayoría de estos factores son comunes a los encontrados para EfmRA, lo que indicaría que el riesgo de colonización/infección por estos microorganismos no depende tanto de la resistencia antibiótica como de las características intrínsecas del hospedador como de los propios clones epidémicos. Todos los aislados caracterizados durante el brote portaban factores de virulencia como Acm y dependiendo del clon, también Esp<sub>Efm</sub> o Hyl<sub>Efm</sub>, además de las bacteriocinas EntA y Bac43, detectada por otros autores en aislados de EVR [301,302]. Como avanzamos previamente en esta discusión, pensamos que todos estos factores contribuyen a la supervivencia de *E. faecium* a nivel intestinal y como han sugerido otros autores, podrían desempeñar también un papel en la persistencia.

En todos los aislados que detectamos, salvo en uno, la resistencia a vancomicina estuvo codificada por el operón VanA asociado al transposón Tn1546 que difirió de las variantes del prototipo descritas hasta la fecha [257,303]. El operón VanA que identificamos carecía de ORF-1, de los genes *vanR* y *vanS* y tenía una secuencia de inserción entre los genes *vanA* y *vanX*. La ausencia de los genes *vanR* y *vanS* parecería indicar que el sistema de regulación del operón no estaba presente y, por tanto, la resistencia a vancomicina se expresaría de manera constitutiva, aún en ausencia de este antibiótico. Además, el hecho de que detectáramos el mismo operón *van* en los diferentes clones de EVR y, pese a no haber podido demostrar la transferencia de este elemento en condiciones de laboratorio, sugiere la diseminación del plásmido en el que va contenido el transposón Tn1546-VanA desde el clon ST17 a los distintos clones ST117.

La exposición a pacientes colonizados y/o infectados también se ha asociado a la colonización del personal sanitario, que tiene un papel fundamental en la transmisión cruzada de EVR. Bonten y cols. observaron que la presión de colonización, definida como el porcentaje de pacientes en una unidad colonizados por EVR, incrementaba la probabilidad de adquisición de EVR de 1,4-10%. Además observaron que cuando las tasas de colonización sobrepasaban el 50%, éste se convertía en el principal factor de riesgo de diseminación de EVR en una unidad [304].

Los expertos en el control de la infección nosocomial señalan cuatro medidas para el control de la diseminación de EVR en las instituciones sanitarias: 1) cultivos periódicos de vigilancia activa de pacientes de riesgo, 2) lavado de manos y uso de soluciones antisépticas antes y después del contacto con el paciente, 3) adherencia a las precauciones de barrera y aislamiento, y 4) limpieza exhaustiva de las habitaciones. De estas medidas la que generalmente tiene mayor impacto es el lavado correcto de manos, aunque esta medida no siempre alcanza los niveles de cumplimiento óptimo por el personal sanitario. [305].

Oliver Wendell Holmes fue la primera persona en describir la transmisión directa de posibles agentes infecciosos a las puérperas a través de las manos contaminadas del médico [306]. Sin embargo, el reconocimiento mundial de esta relevante observación ha sido clásicamente atribuido a Ignaz Philipp Semmelweis, que estudió el papel de la desinfección de las manos en su tesis doctoral [307]. Ambos autores resaltaron por primera vez el papel que podían desempeñar las manos humanas contaminadas con "partículas cadavéricas" en el

proceso de transmisión, y este concepto ha permanecido hasta nuestros días, donde la higiene de las manos sigue siendo una liturgia en los procedimientos quirúrgicos, pero también una medida general con un papel fundamental en la prevención y control de las enfermedades transmisibles.

Hoy en día se acepta que la higiene de las manos del personal sanitario es la mejor medida para la prevención de la infección nosocomial y la aparición de brotes [308]. En 2009, con el objetivo de estandarizar el lavado de manos entre el personal sanitario, la Organización Mundial de la Salud publicó unas directrices universales para su correcta realización ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44102/1/9789241597906\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44102/1/9789241597906_eng.pdf)). Pese a la existencia de evidencia suficiente para confirmar la clara relación entre la correcta higiene de las manos de los trabajadores sanitarios y la disminución de la infección nosocomial; su cumplimiento general es inferior al 40% [309]. Recientemente se han incorporado soluciones alcohólicas para la higiene de las manos que son capaces de eliminar el 99,99% de la microbiota de la mano, mientras que el agua de lavado sólo alcanza un 95% [310,311].

Como ocurre en otras localizaciones del cuerpo humano, la microbiota comensal de las manos podría contribuir a prevenir la colonización y el crecimiento de patógenos externos. En ese sentido, una reducción controlada de la densidad de la microbiota de las manos podría ser mejor que una desinfección completa. La microbiota habitual de nuestras manos se ve influenciada por parámetros fisiológicos como el pH, la humedad y la temperatura. Además su composición puede variar en las diferentes localizaciones, en relación con la distribución de los folículos pilosos, glándulas sebáceas, ecrinas, apocrinas, cicatrices o imperfecciones anatómicas [312]. Se han descrito diferencias según del estrato de la piel y se ha observado que las bacterias transitorias que no forman parte de la microbiota habitual se localiza normalmente en las secciones más superficiales [313]. Aunque las diferencias entre individuos son bastante significativas, la composición intra-individual de esta microbiota permanece relativamente estable a lo largo del tiempo. Sin embargo son frecuentes las fluctuaciones diarias que afectan a su densidad que con frecuencia se originan después del lavado de las manos o de la existencia de algún tipo de fricción externa [314]. Otros autores han observado la existencia de diferencias en función del género, siendo las mujeres las que tienen una mayor diversidad bacteriana; y curiosamente también se ha demostrado una mayor diversidad en la mano dominante [314]. Por el momento no se han evaluado adecuadamente los efectos que puedan tener la edad o la raza.

Como ya se ha comentado, la adquisición de enterococos, tanto los sensibles a vancomicina como los resistentes, por exposición manual a los fómites o superficies contaminadas es un punto crítico en la infección nosocomial, particularmente para los trabajadores de la salud ya que pueden actuar como diseminadores de estos microorganismos [47].

Pese al número de trabajos realizados centrados en la transmisión de bacterias a través de la piel, las variaciones intraindividuales no se han evaluado, y es por ello que en este trabajo nos planteamos investigar este aspecto de la transmisión. Con el sencillo experimento que diseñamos hemos podido observar diferencias importantes, aunque no significativas en la transmisión de los dos aislados de *E. faecium* entre los nueve voluntarios, lo que nos permitió clasificarlos en transmisores altos, medios o bajos en función de las caídas en los recuentos entre el primer y el último dedo. La mayoría de estos voluntarios se clasificó en el mismo grupo de transmisión con independencia de la cepa y destaca la elevada capacidad de transmisión de uno de ellos. Esto parece apoyar la teoría de que uno de los principales factores que

condicionan la transmisión es el propio individuo. También se detectaron diferencias según el clon, siendo *E. faecium*-ST117 ligeramente más transmisible que el clon L50-ST178, resultados que contrarios a lo que observamos posteriormente en un trabajo realizado con un mayor número voluntarios [315]. Aunque hombres y mujeres tienen diferencias significativas en la composición de su piel (pH, producción de sebo o sudor, grosor de la piel...) que podrían influir su capacidad de transmisión, no pudimos estudiarlas por el bajo tamaño muestral. También deberíamos considerar las diferencias en cuanto a la composición lipídica de la piel, mucho más cuando son lípidos también los que componen la superficie externa de las bacterias. Las interacciones químicas y físicas entre los lípidos bacterianos y los humanos pueden determinar la adherencia final de las bacterias a la capa superficial de la piel. Hasta donde sabemos, este es uno de los pocos trabajos que ha estudiado las diferencias en la transmisión bacteriana entre los individuos y clones de una misma especie.









## CONCLUSIONES

---



1. Los pacientes oncohematológicos en tratamiento quimioterápico presentan una marcada reducción de la densidad y de la diversidad de su microbiota intestinal, particularmente tras la profilaxis extendida con levofloxacino. Hasta dos tercios de estos pacientes se colonizan persistentemente por clones hospitalarios de *Enterococcus faecium* resistente a la ampicilina.
2. *Enterococcus faecium* resistente a la ampicilina es una causa frecuente de bacteriemia en pacientes oncohematológicos en el Hospital Ramón y Cajal y la colonización intestinal por estos mismos clones, precede al desarrollo de bacteriemia.
3. En nuestro entorno predomina el clon epidémico EfmRA-ST117-B, y su éxito ecológico podría estar asociado a factores de virulencia y persistencia, su capacidad de producir bacteriocinas frente a un elevado número de clones de la misma especie y a su capacidad de metabolizar algunos polioles.
4. Se ha evidenciado buena concordancia entre la técnica de tipificación fenotípica PhP y la electroforesis en campo pulsado (PFGE) en la estructura poblacional de *Enterococcus faecium*, siempre que se utilice como índice de similitud un valor de 0,9.
5. Se ha demostrado la emergencia *in vivo* de resistencia a linezolid en aislados de colonización intestinal de *Enterococcus faecium* resistentes a la ampicilina, tras la administración de este antibiótico, debido a la presencia de la mutación G2576T en 4 de los 6 alelos del gen 23S rARN.
6. Los aislados de *Enterococcus faecium* presentan mayor capacidad para adherirse a las células epiteliales intestinales que los aislados de *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, con independencia su origen epidemiológico.
7. Los aislados humanos de *Enterococcus faecium* y *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* no tienen capacidad para invadir las células del epitelio intestinal o lo hacen en muy baja proporción. Únicamente el aislado de *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* de procedencia animal demostró una alta capacidad invasiva.
8. La formación de biofilm por cepas de *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* es notablemente mayor en superficies tapizadas con colágeno I y colágeno IV, mientras que las cepas de *Enterococcus faecium* sólo lo hacen, y en mucho menor grado, sobre superficies enriquecidas en colágeno IV.
9. Ante un epitelio intestinal intacto, *Enterococcus faecium* es capaz de traslocar en mayor proporción que *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, si bien existen diferencias intraespecie según la cepa, siendo los clones epidémicos que mejor traslocan.

10. Se ha detectado y caracterizado un brote silente de *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina en el Hospital Ramón y Cajal, como consecuencia de la diseminación de un clon mayoritario con el genotipo *vanA*. Su descubrimiento ha sido posible gracias al funcionamiento de un sistema de vigilancia activa para enterobacterias productoras de carbapenemasas.
11. El estudio de la transmisión de cepas de *Enterococcus faecium* empleando un nuevo modelo de contacto dedo-dedo ha puesto de manifiesto que los factores relacionados con los individuos pueden ser determinantes en la diseminación bacteriana.







## BIBLIOGRAFÍA

---





- [1] Mundt JO. Occurrence of enterococci: Bud, Blossom, and Soil Studies. *Appl Microbiol* 1961;9:541–4. [16]
- [2] Mundt JO. Occurrence of enterococci on plants in a wild environment. *Appl Microbiol* 1963;11:141–4. [17]
- [3] Mundt JO. Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. *Appl Microbiol* 1963;11:136–40. [18]
- [4] Thiercelin M, Jouhaud L. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. *CR Soc Biol* 1989;51:269–71. [19]
- [5] Lebreton F, Willems RJL GM. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: Gilmore, MS, Clewell, DB, Ike, Y, Shankar N, editor. *Enterococci From Commensals to Lead. Causes Drug Resist. Infect.*, Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. [20]
- [6] Maccallum WG, Hastings TW. a Case of Acute Endocarditis Caused By *Micrococcus zymogenes* (Nov. Spec.), With a Description of the Microorganism. *J Exp Med* 1899;4:521–34. doi:10.1084/jem.4.5-6.521. [21]
- [7] Birge EG. Some observations on the occurrence of *Micrococcus zymogenes*. *Bul Johns Hopkins Hosp* 1905;16:309–11. [22]
- [8] Hicks JAB. An unusual organism (*Micrococcus zymogenes*) in a case of malignant endocarditis. *Proc Roy Soc Med* 1912;5:125–30. [23]
- [9] J. C. Torrey EM. The cultural and agglutinative relationships of intestinal streptococci. *Jour Inf Dis* 1934;55:340–55. [24]
- [10] Sherman JM, Stark P. Streptococci which grow at high temperatures. *Jour Bact* 1931;22:275–86. [25]
- [11] Andrewes FW, Horder TJ. A study of streptococci pathogenic for man. *Lancet* n.d.;168:852–855. [26]
- [12] Orla-Jensen S. The lactic acid bacteria. *Memoirs of the Academy of the Royal Society of Denmark. Sect Sci Ser* 1919;85:181–97. [27]
- [13] Sherman JM. The Streptococci. *Bacteriol Rev* 1937;1:3–97. [28]
- [14] Kalina AP. [The position of enterococci in the system of microorganisms]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1970;47:20–1. [29]
- [15] Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1984;34:31–4. doi:10.1099/00207713-34-1-31. [30]
- Freeman R, Kearns AM, Lightfoot NF. Heat resistance of nosocomial enterococci. *Lancet* (London, England) 1994;344:64–5. [31]
- Kearns AM, Freeman R, Lightfoot NF. Nosocomial enterococci: resistance to heat and sodium hypochlorite. *J Hosp Infect* 1995;30:193–9. [32]
- Bradley CR, Fraiese AP. Heat and chemical resistance of enterococci. *J Hosp Infect* 1996;34:191–6. [33]
- Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:46–65. [34]
- Gilmore MS, Lebreton F, van Schaik W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr Opin Microbiol* 2013;16:10–6. doi:10.1016/j.mib.2013.01.006. [35]
- Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol* 1989;27:731–4. [36]
- Zhang X, Vrijenhoek JEP, Bonten MJM, Willems RJL, van Schaik W. A genetic element present on megaplasms allows *Enterococcus faecium* to use raffinose as carbon source. *Environ Microbiol* 2011;13:518–28. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02355.x. [37]
- Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JI. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat Immunol* 2004;5:569–73. doi:10.1038/ni1079. [38]
- Xie G, Jia W. Using metabolomics to analyse the role of gut microbiota in nutrition and disease. *Metabolomics as a tool in nutrition and disease*. In: J.L. Sebedio LB, editor. *Metabolomics as a Tool Nutr. Res.*, Woodhead Publishing series; 2015, p. 115–36. [39]
- Hill DA, Hoffmann C, Abt MC, Du Y, Kobuley D, Kirn TJ, et al. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. *Mucosal Immunol* 2010;3:148–58. doi:10.1038/mi.2009.132. [40]
- Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes V, Sokol H, Doré J, et al. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 2009;9:123. doi:10.1186/1471-2180-9-123. [41]
- Enck P, Zimmermann K, Rusch K, Schwartz A, Klosterhalfen S, Frick J-S. The effects of ageing on the colonic bacterial microflora in

- p>adults.
- Z Gastroenterol*
- 2009;47:653–8. doi:10.1055/s-0028-1109055.
- [28] Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol* 2014;16:1024–33. doi:10.1111/cmi.12308.
- [29] Daliri EB-M, Wei S, Oh DH, Lee BH. The Human Microbiome and Metabolomics: Current Concepts and Applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016. doi:10.1080/10408398.2016.1220913.
- [30] Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet* (London, England) 2003;361:512–9. doi:10.1016/S0140-6736(03)12489-0.
- [31] Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2015;31:69–75. doi:10.1097/MOG.0000000000000139.
- [32] Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 1996;4:430–5.
- [33] Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984;86:174–93.
- [34] Noble CJ. Carriage of group D streptococci in the human bowel. *J Clin Pathol* 1978;31:1182–6. doi:10.1136/jcp.31.12.1182.
- [35] Willems RJ, van Schaik W. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol* 2009;4:1125–35. doi:10.2217/fmb.09.82.
- [36] Cattoir V, Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother* 2013;68:731–42. doi:10.1093/jac/dks469.
- [37] Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, van Embden J, et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemics. *J Bacteriol* 2004;186:672–82.
- [38] Heikens E, Bonten MJM, Willems RJL. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol* 2007;189:8233–40. doi:10.1128/JB.01205-07.
- [39] Leendertse M, Heikens E, Wijnands LM, van Luit-Asbroek M, Teske GJD, Roelofs JJTH, et al. Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium*-induced urinary tract infection in mice. *J Infect Dis* 2009;200:1162–5. doi:10.1086/605609.
- [40] Heikens E, Singh K V, Jacques-Palaz KD, van Luit-Asbroek M, Oostdijk EAN, Bonten MJM, et al. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. *Microbes Infect* 2011;13:1185–90. doi:10.1016/j.micinf.2011.08.006.
- [41] Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:533–40. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03213.x.
- [42] Sillanpää J, Prakash VP, Nallapareddy SR, Murray BE. Distribution of genes encoding MSCRAMMs and Pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2009;47:896–901. doi:10.1128/JCM.02283-08.
- [43] Nallapareddy SR, Singh K V, Okhuysen PC, Murray BE. A functional collagen adhesin gene, acm, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect Immun* 2008;76:4110–9. doi:10.1128/IAI.00375-08.
- [44] Hendrickx APA, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CME, van Wamel WJB, Braat JC, Wijnands LM, et al. SgrA, a nidogen-binding LPXTG surface adhesin implicated in biofilm formation, and EcbA, a collagen binding MSCRAMM, are two novel adhesins of hospital-acquired *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 2009;77:5097–106. doi:10.1128/IAI.00275-09.
- [45] Sillanpää J, Nallapareddy SR, Prakash VP, Qin X, Höök M, Weinstock GM, et al. Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *Enterococcus faecium*. *Microbiology* 2008;154:3199–211. doi:10.1099/mic.0.2008/017319-0.
- [46] Hendrickx APA, Bonten MJM, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CME, Kragten AHM, Willems RJL. Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired *Enterococcus faecium* isolate. *Microbiology* 2008;154:3212–23. doi:10.1099/mic.0.2008/020891-0.
- [47] Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:266–78. doi:10.1038/nrmicro2761.
- [48] Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, et al. A Potential Virulence Gene, *hyl<sub>Efm</sub>*, Predominates in *Enterococcus faecium* of Clinical Origin. *J Infect Dis* 2003;187:508–12. doi:10.1086/367711.
- [49] Freitas AR, Tedim AP, Novais C, Ruiz-

- Garbajosa P, Werner G, Laverde-Gomez JA, et al. Global Spread of the hylEfm Colonization-Virulence Gene in Megaplasms of the *Enterococcus faecium* CC17 Polyclonal Subcluster. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2660–5. doi:10.1128/AAC.00134-10. [60]
- [50] Sheldon WL, Macauley MS, Taylor EJ, Robinson CE, Charnock SJ, Davies GJ, et al. Functional analysis of a group A streptococcal glycoside hydrolase Spy1600 from family 84 reveals it is a  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and not a hyaluronidase. *Biochem J* 2006;399:241–7. doi:10.1042/BJ20060307. [62]
- [51] Rice LB, Laktičová V, Carias LL, Rudin S, Hutton R, Marshall SH. Transferable Capacity for Gastrointestinal Colonization in *Enterococcus faecium* in a Mouse Model. *J Infect Dis* 2009;199:342–9. doi:10.1086/595986. [63]
- [52] Arias CA, Panesso D, Singh K V., Rice LB, Murray BE. Cotransfer of Antibiotic Resistance Genes and a hylEfm-Containing Virulence Plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4240–6. doi:10.1128/AAC.00242-09. [64]
- [53] Nes IF, Diep DB, Holo H. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol* 2007;189:1189–98. doi:10.1128/JB.01254-06. [65]
- [54] Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009;155:1749–57. doi:10.1099/mic.0.026385-0. [66]
- [55] Garneau S, Martin NI, Vederas JC. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* n.d.;84:577–92. [67]
- [56] Nes IF, Diep DB IY. Enterococcal Bacteriocins and Antimicrobial Proteins that Contribute to Niche Control. In: Gilmore, MS, Clewell, DB, Ike, Y, Shankar N, editor. *Enterococci From Commensals to Lead. Causes Drug Resist. Infect.*, Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. [68]
- [57] Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8:881–90. doi:10.3201/eid0809.020063. [69]
- [58] Garsin DA, Willems RJL. Insights into the biofilm lifestyle of enterococci. *Virulence* 2010;1:219–21. doi:10.4161/viru.1.4.12073. [70]
- [59] Willems RJ, Homan W, Top J, van Santen-Verheul M, Tribe D, Manziros X, et al. Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet* 2001;357:853–5. doi:10.1016/S0140-6736(00)04205-7. [71]
- Neu HC. Penicillin-binding proteins and beta-lactamases: their effects on the use of cephalosporins and other new beta-lactams. *Curr Clin Top Infect Dis* 1987;8:37–61.
- Witte W, Wirth R, Klare I. Enterococci. *Chemotherapy* n.d.;45:135–45. doi:7174.
- K. E. Weaver, L. B. Rice GC. Plasmids and Transposons. In: MS MSG, editor. *Enterococci; Pathog. Mol. Biol. Antibiot. Resist.*, Washington: ASM Press; 2002, p. 219–264.
- Morosini MI, Cantón R. [Tolerance and heteroresistance in Gram-positive microorganisms]. *Med Clin (Barc)* 2010;135 Suppl:16–22. doi:10.1016/S0025-7753(10)70036-1.
- C. K. Kristich, L. B. Rice CA. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In: Gilmore, MS, Clewell, DB, Ike, Y, Shankar N, editor. *Enterococci From Commensals to Lead. Causes Drug Resist. Infect. Infirmary*, Boston: 2014, p. 87–134.
- Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:297–308. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00383.x.
- Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014;12. doi:10.1586/14787210.2014.956092.
- Rice LB, Bellais S, Carias LL, Hutton-Thomas R, Bonomo RA, Caspers P, et al. Impact of specific pbp5 mutations on expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3028–32. doi:10.1128/AAC.48.8.3028-3032.2004.
- Sifaoui F, Arthur M, Rice L, Gutmann L. Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2594–7.
- Fontana R, Aldegheri M, Ligozzi M, Lopez H, Sucari A, Satta G. Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1980–3.
- Coudron PE, Markowitz SM, Wong ES. Isolation of a beta-lactamase-producing, aminoglycoside-resistant strain of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1125–6.
- Mainardi JL, Legrand R, Arthur M, Schoot B, van Heijenoort J, Gutmann L. Novel

- mechanism of beta-lactam resistance due to bypass of DD-transpeptidation in *Enterococcus faecium*. J Biol Chem 2000;275:16490–6. doi:10.1074/jbc.M909877199.
- [72] Zhang X, Paganelli FL, Bierschenk D, Kuipers A, Bonten MJM, Willems RJL, et al. Genome-wide identification of ampicillin resistance determinants in *Enterococcus faecium*. PLoS Genet 2012;8:e1002804. doi:10.1371/journal.pgen.1002804.
- [73] Barna JC, Williams DH. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. Annu Rev Microbiol 1984;38:339–57. doi:10.1146/annurev.mi.38.100184.002011.
- [74] Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin Infect Dis 2006;42 Suppl 1:S25-34. doi:10.1086/491711.
- [75] Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, et al. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:4643–7. doi:10.1128/AAC.01710-09.
- [76] Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, et al. D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:4606–12. doi:10.1128/AAC.00714-11.
- [77] Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2667–72. doi:10.1128/AAC.01516-07.
- [78] Ammam F, Marvaud J-C, Lambert T. Distribution of the *vanG*-like gene cluster in *Clostridium difficile* clinical isolates. Can J Microbiol 2012;58:547–51. doi:10.1139/w2012-002.
- [79] Marvaud J-C, Mory F, Lambert T. *Clostridium clostridioforme* and *Atopobium minutum* clinical isolates with *vanB*-type resistance in France. J Clin Microbiol 2011;49:3436–8. doi:10.1128/JCM.00308-11.
- [80] Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science 2003;302:1569–71. doi:10.1126/science.1090956.
- [81] Nishiyama M, Iguchi A, Suzuki Y. Identification of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* as vanC-type Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) from sewage and river water in the provincial city of Miyazaki, Japan. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 2015;50:16–25. doi:10.1080/10934529.2015.964599.
- Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, Tally FP. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. J Antimicrob Chemother 2005;55:283–8. doi:10.1093/jac/dkh546.
- Murahi JK, Harris J, Taylor SD, Palmer M. Characterization of daptomycin oligomerization with perylene excimer fluorescence: stoichiometric binding of phosphatidylglycerol triggers oligomer formation. Biochim Biophys Acta 2012;1818:673–8. doi:10.1016/j.bbamem.2011.10.027.
- Zhang T, Murahi JK, Tishbi N, Herskowitz J, Victor RL, Silverman J, et al. Cardiolipin prevents membrane translocation and permeabilization by daptomycin. J Biol Chem 2014;289:11584–91. doi:10.1074/jbc.M114.554444.
- Tran TT, Panesso D, Gao H, Roh JH, Munita JM, Reyes J, et al. Whole-genome analysis of a daptomycin-susceptible *Enterococcus faecium* strain and its daptomycin-resistant variant arising during therapy. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:261–8. doi:10.1128/AAC.01454-12.
- Mishra NN, Bayer AS, Tran TT, Shamoo Y, Mileykovskaya E, Dowhan W, et al. Daptomycin resistance in enterococci is associated with distinct alterations of cell membrane phospholipid content. PLoS One 2012;7:e43958. doi:10.1371/journal.pone.0043958.
- Diaz L, Tran TT, Munita JM, Miller WR, Rincon S, Carvajal LP, et al. Whole-genome analyses of *Enterococcus faecium* isolates with diverse daptomycin MICs. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:4527–34. doi:10.1128/AAC.02686-14.
- Costa Y, Galimand M, Leclercq R, Duval J, Courvalin P. Characterization of the chromosomal *aac(6')-II* gene specific for *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:1896–903.
- Galimand M, Schmitt E, Panvert M, Desmolaize B, Douthwaite S, Mechulam Y, et al. Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM. RNA 2011;17:251–62.

doi:10.1261/rna.2233511.

- [90] Eliopoulos GM, Farber BF, Murray BE, Wennersten C, Moellering RC. Ribosomal resistance of clinical enterococcal to streptomycin isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;25:398–9.
- [91] Krogstad DJ, Korfhagen TR, Moellering RC, Wennersten C, Swartz MN. Aminoglycoside-inactivating enzymes in clinical isolates of *Streptococcus faecalis*. An explanation for resistance to antibiotic synergism. *J Clin Invest* 1978;62:480–6. doi:10.1172/JCI109149.
- [92] Courvalin P, Carlier C, Collatz E. Plasmid-mediated resistance to aminocyclitol antibiotics in group D streptococci. *J Bacteriol* 1980;143:541–51.
- [93] Canu A, Leclercq R. Overcoming bacterial resistance by dual target inhibition: the case of streptogramins. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2001;1:215–25.
- [94] Werner G, Klare I, Witte W. Molecular analysis of streptogramin resistance in enterococci. *Int J Med Microbiol* 2002;292:81–94. doi:10.1078/1438-4221-00194.
- [95] Isnard C, Malbruny B, Leclercq R, Cattoir V. Genetic basis for in vitro and in vivo resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins (LSAP phenotype) in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:4463–9. doi:10.1128/AAC.01030-13.
- [96] Diekema DJ, Jones RN. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet* (London, England) 2001;358:1975–82. doi:10.1016/S0140-6736(01)06964-1.
- [97] Klare I, Fleige C, Geringer U, Thürmer A, Bender J, Mutters NT, et al. Increased frequency of linezolid resistance among clinical *Enterococcus faecium* isolates from German hospital patients. *J Glob Antimicrob Resist* 2015;3:128–31. doi:10.1016/j.jgar.2015.02.007.
- [98] Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R, Salata R a., Rice LB. Gene Dosage and Linezolid Resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3334–6. doi:10.1128/AAC.46.10.3334-3336.2002.
- [99] Bourgeois-Nicolaos N, Massias L, Couson B, Butel M-J, Andremont A, Doucet-Populaire F. Dose dependence of emergence of resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis* in vivo. *J Infect Dis* 2007;195:1480–8. doi:10.1086/513876.
- [100] Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in staphylococci of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5275–8. doi:10.1128/AAC.01032-09.
- [101] Hennig S, Ziebuhr W. Characterization of the transposase encoded by IS256, the prototype of a major family of bacterial insertion sequence elements. *J Bacteriol* 2010;192:4153–63. doi:10.1128/JB.00226-10.
- [102] Diaz L, Kiratisin P, Mendes RE, Panesso D, Singh K V, Arias CA. Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to cfr in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:3917–22. doi:10.1128/AAC.00419-12.
- [103] Bender JK, Fleige C, Klare I, Fiedler S, Mischnik A, Mutters NT, et al. Detection of a cfr(B) Variant in German *Enterococcus faecium* Clinical Isolates and the Impact on Linezolid Resistance in *Enterococcus* spp. *PLoS One* 2016;11:e0167042. doi:10.1371/journal.pone.0167042.
- [104] Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol* 2005;57:1064–73. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04754.x.
- [105] Mendes RE, Deshpande LM, Castanheira M, DiPersio J, Saubolle MA, Jones RN. First report of cfr-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2244–6. doi:10.1128/AAC.00231-08.
- [106] Zhanel GG, Love R, Adam H, Golden A, Zelenitsky S, Schweizer F, et al. Tedizolid: a novel oxazolidinone with potent activity against multidrug-resistant gram-positive pathogens. *Drugs* 2015;75:253–70. doi:10.1007/s40265-015-0352-7.
- [107] Wang Y, Lv Y, Cai J, Schwarz S, Cui L, Hu Z, et al. A novel gene, optrA, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:2182–90. doi:10.1093/jac/dkv116.
- [108] el Amin NA, Jalal S, Wretling B. Alterations in GyrA and ParC associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:947–9.
- [109] Brisse S, Fluit AC, Wagner U, Heisig P, Milatovic D, Verhoef J, et al. Association of alterations in ParC and GyrA proteins with resistance of clinical isolates of *Enterococcus*

- faecium* to nine different fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2513–6.
- [110] Kanematsu E, Deguchi T, Yasuda M, Kawamura T, Nishino Y, Kawada Y. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:433–5.
- [111] López M, Tenorio C, Del Campo R, Zarazaga M, Torres C. Characterization of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in vancomycin-resistant enterococci of different origins. J Chemother 2011;23:87–91. doi:10.1179/joc.2011.23.2.87.
- [112] Cercenado E. [*Enterococcus*: phenotype and genotype resistance and epidemiology in Spain]. Enferm Infecc Microbiol Clin 2011;29 Suppl 5:59–65. doi:10.1016/S0213-005X(11)70045-3.
- [113] Oyamada Y, Ito H, Fujimoto K, Asada R, Niga T, Okamoto R, et al. Combination of known and unknown mechanisms confers high-level resistance to fluoroquinolones in *Enterococcus faecium*. J Med Microbiol 2006;55:729–36. doi:10.1099/jmm.0.46303-0.
- [114] Coudron PE, Mayhall CG, Facklam RR, Spadora AC, Lamb VA, Lybrand MR, et al. *Streptococcus faecium* outbreak in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol 1984;20:1044–8.
- [115] Grayson ML, Eliopoulos GM, Wennersten CB, Ruoff KL, De Girolami PC, Ferraro MJ, et al. Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:2180–4.
- [116] Chirugi VA, Oster SE, Goldberg AA, McCabe RE. Nosocomial acquisition of beta-lactamase-negative, ampicillin-resistant *Enterococcus*. Arch Intern Med 1992;152:1457–61.
- [117] Ramsey AM, Zilberberg MD. Secular Trends of Hospitalization With Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Infection in the United States, 2000–2006. Infect Control Hosp Epidemiol 2009;30:184–6. doi:10.1086/593956.
- [118] Hayden MK. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. Clin Infect Dis 2000;31:1058–65. doi:10.1086/318126.
- [119] Torell E, Kühn I, Olsson-Liljequist B, Haeggman S, Hoffman B-M, Lindahl C, et al. Clonality among ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in Sweden and relationship with ciprofloxacin resistance. Clin Microbiol Infect 2003;9:1011–9.
- [120] Lester CH, Sandvang D, Olsen SS, Schonheyder HC, Jarlov JO, Bangsbo J, et al. Emergence of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* in Danish hospitals. J Antimicrob Chemother 2008;62:1203–6. doi:10.1093/jac/dkn360.
- [121] Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med 1988;319:157–61. doi:10.1056/NEJM198807213190307.
- [122] Van der Auwera P, Pensart N, Korten V, Murray BE, Leclercq R. Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide-resistant enterococci. J Infect Dis 1996;173:1129–36.
- [123] van den Bogaard AE, Mertens P, London NH, Stobberingh EE. High prevalence of colonization with vancomycin- and pristinamycin-resistant enterococci in healthy humans and pigs in The Netherlands: is the addition of antibiotics to animal feeds to blame? J Antimicrob Chemother 1997;40:454–6.
- [124] van den Bogaard AE, Willems R, London N, Top J, Stobberingh EE. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J Antimicrob Chemother 2002;49:497–505.
- [125] Bager F, Madsen M, Christensen J, Aarestrup FM. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. Prev Vet Med 1997;31:95–112.
- [126] Howarth F, Poulter D. Avoparcin ban. Vet Rec 1997;140:103–4.
- [127] Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. Euro Surveill 2008;13.
- [128] Treitman AN, Yarnold PR, Warren J, Noskin GA. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). J Clin Microbiol 2005;43:462–3. doi:10.1128/JCM.43.1.462-463.2005.
- [129] Iwen PC, Kelly DM, Linder J, Hinrichs SH, Dominguez EA, Rupp ME, et al. Change in prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from blood cultures over an 8-year period. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:494–5.
- [130] Higueta NIA, Huycke MM. Enterococcal

- Disease , Epidemiology , and Implications for Treatment. *Enterococci From Commensals to Lead Causes Drug Resist Infect* 2014;1–27.
- [131] Basavaraj Vp, Basavaraj Cm, Parameswarappa J. Isolation, identification, and antibiogram of enterococci isolated from patients with urinary tract infection. *Ann Afr Med* 2013;12:176. doi:10.4103/1596-3519.117629.
- [132] Wang Q-Y, Li R-H, Shang X-H. Urinary tract infection caused by *Enterococcus* isolates: aetiology and antimicrobial resistance patterns. *J Chemother* 2015;27:117–9. doi:10.1179/1973947814Y.0000000192.
- [133] Felmingham D, Wilson AP, Quintana AI, Grüneberg RN. *Enterococcus* species in urinary tract infection. *Clin Infect Dis* 1992;15:295–301.
- [134] Bagshaw SM, Laupland KB. Epidemiology of intensive care unit-acquired urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19:67–71.
- [135] Sitges-Serra A, Lopez MJ, Girvent M, Almirall S, Sancho JJ. Postoperative enterococcal infection after treatment of complicated intra-abdominal sepsis. *Br J Surg* 2002;89:361–7. doi:10.1046/j.0007-1323.2001.02023.x.
- [136] Cercenado E, Torroba L, Canton R, Martinez-Martinez L, Chaves F, Garcia-Rodriguez JA, et al. Multicenter Study Evaluating the Role of Enterococci in Secondary Bacterial Peritonitis. *J Clin Microbiol* 2010;48:456–9. doi:10.1128/JCM.01782-09.
- [137] Marcus G, Levy S, Salhab G, Mengesha B, Tzuman O, Shur S, et al. Intra-abdominal Infections: The Role of Anaerobes, Enterococci, Fungi, and Multidrug-Resistant Organisms. *Open Forum Infect Dis* 2016;3:ofw232. doi:10.1093/ofid/ofw232.
- [138] Dupont H, Friggeri A, Touzeau J, Airapetian N, Tinturier F, Lobjoe E, et al. Enterococci increase the morbidity and mortality associated with severe intra-abdominal infections in elderly patients hospitalized in the intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2379–85. doi:10.1093/jac/dkr308.
- [139] Seguin P, Brianchon C, Launey Y, Laviolle B, Nesseler N, Donnio P-Y, et al. Are enterococci playing a role in postoperative peritonitis in critically ill patients? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:1479–85. doi:10.1007/s10096-011-1467-8.
- [140] Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013;34:1–14. doi:10.1086/668770.
- [141] Hamada Y, Magarifuchi H, Oho M, Kusaba K, Nagasawa Z, Fukuoka M, et al. Clinical features of enterococcal bacteremia due to ampicillin-susceptible and ampicillin-resistant enterococci: An eight-year retrospective comparison study. *J Infect Chemother* 2015;21:527–30. doi:10.1016/j.jiac.2015.04.001.
- [142] Pinholt M, Østergaard C, Arpi M, Bruun NE, Schønheyder HC, Gradel KO, et al. Incidence, clinical characteristics and 30-day mortality of enterococcal bacteraemia in Denmark 2006–2009: A population-based cohort study. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:145–51. doi:10.1111/1469-0691.12236.
- [143] Cheah AAY, Spelman T, Liew D, Peel T, Howden BP, Spelman D, et al. Enterococcal bacteraemia: factors influencing mortality, length of stay and costs of hospitalization. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E181–9. doi:10.1111/1469-0691.12132.
- [144] Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG, Bayer AS, et al. Clinical Presentation, Etiology, and Outcome of Infective Endocarditis in the 21st Century. *Arch Intern Med* 2009;169:463. doi:10.1001/archinternmed.2008.603.
- [145] Pericás JM, Zboromyrska Y, Cervera C, Castañeda X, Almela M, Garcia-de-la-Maria C, et al. Enterococcal endocarditis revisited. *Future Microbiol* 2015;10:1215–40. doi:10.2217/fmb.15.46.
- [146] Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Management of Multi-Drug Resistant Enterococcal Infections. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:555–62. doi:10.1111/j.1198-743X.2010.03214.x.
- [147] Pericas JM, Cervera C, del Rio A, Moreno A, Garcia de la Maria C, Almela M, et al. Changes in the treatment of *Enterococcus faecalis* infective endocarditis in Spain in the last 15 years: from ampicillin plus gentamicin to ampicillin plus ceftriaxone. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O1075–83. doi:10.1111/1469-0691.12756.
- [148] Fernández-Hidalgo N, Almirante B, Gavalda J, Gurgui M, Peña C, de Alarcón A, et al. Ampicillin Plus Ceftriaxone Is as Effective as Ampicillin Plus Gentamicin for Treating *Enterococcus faecalis* Infective Endocarditis. *Clin Infect Dis* 2013;56:1261–8. doi:10.1093/cid/cit052.
- [149] Balli EP, Venetis CA, Miyakis S. Systematic



- Review and Meta-Analysis of Linezolid versus Daptomycin for Treatment of Vancomycin-Resistant Enterococcal Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:734–9. doi:10.1128/AAC.01289-13.
- [150] Arias CA, Murray BE. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008;6:637–55. doi:10.1586/14787210.6.5.637.
- [151] Birmingham MC, Rayner CR, Meagher AK, Flavin SM, Batts DH, Schentag JJ. Linezolid for the Treatment of Multidrug-Resistant, Gram-Positive Infections: Experience from a Compassionate-Use Program. *Clin Infect Dis* 2003;36:159–68. doi:10.1086/345744.
- [152] Zhanel GG, Calic D, Schweizer F, Zelenitsky S, Adam H, Lagacé-Wiens PRS, et al. New Lipoglycopeptides. *Drugs* 2010;70:859–86. doi:10.2165/11534440-000000000-00000.
- [153] Biedenbach DJ, Arhin FF, Moeck G, Lynch TF, Sahm DF. *In vitro* activity of oritavancin and comparator agents against staphylococci, streptococci and enterococci from clinical infections in Europe and North America, 2011–2014. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:674–81. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.08.014.
- [154] Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 1986;234:1582–5.
- [155] Miranda AG, Singh K V, Murray BE. DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. *J Clin Microbiol* 1991;29:2752–7.
- [156] Morrison D, Woodford N, Barrett SP, Sisson P, Cookson BD. DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains. *J Clin Microbiol* 1999;37:1084–91.
- [157] Willems RJ, Top J, van Den Braak N, van Belkum A, Endtz H, Mevius D, et al. Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Infect Dis* 2000;182:816–23. doi:10.1086/315752.
- [158] Willems RJL, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis* 2005;11:821–8. doi:10.3201/eid1106.041204.
- [159] Harthug S, Jureen R, Mohn SC, Digranes A, Simonsen GS, Sundsfjord A, et al. The prevalence of faecal carriage of ampicillin-resistant and high-level gentamicin-resistant enterococci among inpatients at 10 major Norwegian hospitals. *J Hosp Infect* 2002;50:145–54. doi:10.1053/jhin.2001.1146.
- [160] Abbassi MS, Achour W, Touati A, Ben Hassen A. *Enterococcus faecium* isolated from bone marrow transplant patients in Tunisia: High prevalence of antimicrobial resistance and low pathogenic power. *Pathol Biol* 2009;57:268–71. doi:10.1016/j.patbio.2008.02.008.
- [161] Belhaj M, Boutiba-Ben Boubaker I, Ben Redjeb S, Bouchami O. Molecular characterisation of high-level ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from hospitalised patients in Tunis. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:284–6. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.04.017.
- [162] Leavis HL, Willems RJL, Top J, Bonten MJM. High-Level Ciprofloxacin Resistance from Point Mutations in *gyrA* and *parC* Confined to Global Hospital-Adapted Clonal Lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2006;44:1059–64. doi:10.1128/JCM.44.3.1059-1064.2006.
- [163] Turner KME, Hanage WP, Fraser C, Connor TR, Spratt BG. Assessing the reliability of eBURST using simulated populations with known ancestry. *BMC Microbiol* 2007;7:30. doi:10.1186/1471-2180-7-30.
- [164] Willems RJL, Hanage WP, Bessen DE, Feil EJ. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:872–900. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00284.x.
- [165] Willems RJL, Top J, van Schaik W, Leavis H, Bonten M, Sirén J, et al. Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *MBio* 2012;3:e00151-12. doi:10.1128/mBio.00151-12.
- [166] Tedim AP, Ruiz-Garbajosa P, Corander J, Rodríguez CM, Cantón R, Willems RJ, et al. Population biology of intestinal enterococcus isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:1820–31. doi:10.1128/AEM.03661-14.
- [167] Galloway-Peña J, Roh JH, Latorre M, Qin X, Murray BE. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS One* 2012;7:e30187. doi:10.1371/journal.pone.0030187.
- [168] Díaz-Mediavilla J, Lizasoain M. [Epidemiology of infections in neutropenic patients]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*

2005;23 Suppl 5:7–13.

- [169] Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T, et al. 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002;34:730–51. doi:10.1086/339215.
- [170] Engervall P, Björkholm M. Infections in neutropenic patients I: aetiology. *Med Oncol* 1995;12:251–6.
- [171] Viscoli C, Varnier O, Machetti M. Infections in patients with febrile neutropenia: epidemiology, microbiology, and risk stratification. *Clin Infect Dis* 2005;40 Suppl 4:S240-5. doi:10.1086/427329.
- [172] Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1966;64:328–40.
- [173] Poyart C, Morand P, Buzyn A. [Etiology of bacterial infections in febrile neutropenic patients: the role of the laboratory in the diagnosis]. *Presse Med* 2004;33:460–6.
- [174] Gaytán-Martínez J, Mateos-García E, Sánchez-Cortés E, González-Llaven J, Casanova-Cardiel LJ, Fuentes-Allen JL. Microbiological findings in febrile neutropenia. *Arch Med Res n.d.*;31:388–92.
- [175] Ramphal R. Changes in the etiology of bacteremia in febrile neutropenic patients and the susceptibilities of the currently isolated pathogens. *Clin Infect Dis* 2004;39 Suppl 1:S25-31. doi:10.1086/383048.
- [176] Bochud PY, Calandra T, Francioli P. Bacteremia due to viridans streptococci in neutropenic patients: a review. *Am J Med* 1994;97:256–64.
- [177] Tancrede CH, Andremonet AO. Bacterial translocation and gram-negative bacteremia in patients with hematological malignancies. *J Infect Dis* 1985;152:99–103.
- [178] Pittet D, Boyce JM. Revolutionising hand hygiene in health-care settings: guidelines revisited. *Lancet Infect Dis* 2003;3:269–70.
- [179] Daniels TL, Talbot TR. Infection Control and Prevention Considerations. *Cancer Treat. Res.*, vol. 161, 2014, p. 463–83. doi:10.1007/978-3-319-04220-6\_15.
- [180] Uriburu C, Rovira M. [Prophylaxis against infections in neutropenic patients]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23 Suppl 5:14–8.
- [181] Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 1999;473:11–30.
- [182] van der Heijden KM, van der Heijden IM, Galvao FH, Lopes CG, Costa SF, Abdala E, et al. Intestinal translocation of clinical isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and ESBL-producing *Escherichia coli* in a rat model of bacterial colonization and liver ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* 2014;9:e108453. doi:10.1371/journal.pone.0108453.
- [183] Storrang RA, Jameson B, McElwain TJ, Wiltshaw E. Oral non-absorbed antibiotics prevent infection in acute non-lymphoblastic leukaemia. *Lancet (London, England)* 1977;2:837–40.
- [184] Gualtieri RJ, Donowitz GR, Kaiser DL, Hess CE, Sande MA. Double-blind randomized study of prophylactic trimethoprim/sulfamethoxazole in granulocytopenic patients with hematologic malignancies. *Am J Med* 1983;74:934–40.
- [185] Del Favero A, Menichetti F. The new fluorinated quinolones for antimicrobial prophylaxis in neutropenic cancer patients. *Eur J Cancer* 1993;S2-6.
- [186] Rozenberg-Arska M, Dekker AW. Ciprofloxacin for infection prevention in patients with acute leukemia. *Pharm Weekbl Sci* 1987;9 Suppl:S45-7.
- [187] Karp JE, Merz WG, Hendricksen C, Laughon B, Redden T, Bamberger BJ, et al. Oral norfloxacin for prevention of gram-negative bacterial infections in patients with acute leukemia and granulocytopenia. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1987;106:1–7.
- [188] Liang RH, Yung RW, Chan TK, Chau PY, Lam WK, So SY, et al. Ofloxacin versus cotrimoxazole for prevention of infection in neutropenic patients following cytotoxic chemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:215–8.
- [189] Talbot GH, Cassileth PA, Paradiso L, Correa-Coronas R, Bond L. Oral enoxacin for infection prevention in adults with acute nonlymphocytic leukemia. The Enoxacin Prophylaxis Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:474–82.
- [190] Bucaneve G, Micozzi A, Menichetti F, Martino P, Dionisi MS, Martinelli G, et al. Levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia. *N Engl J Med* 2005;353:977–87. doi:10.1056/NEJMoa044097.
- [191] Gaftor-Gvili A, Fraser A, Paul M, Leibovici L. Meta-analysis: antibiotic prophylaxis reduces mortality in neutropenic patients. *Ann Intern Med* 2005;142:979–95.

- [192] Bow EJ, Mandell LA, Louie TJ, Feld R, Palmer M, Zee B, et al. Quinolone-based antibacterial chemoprophylaxis in neutropenic patients: effect of augmented gram-positive activity on infectious morbidity. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Ann Intern Med* 1996;125:183–90.
- [193] Timmers GJ, Dijkstra Y, Simoons-Smit AM, van Winkelhoff AJ, Touw DJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, et al. Pharmacokinetics and effects on bowel and throat microflora of oral levofloxacin as antibacterial prophylaxis in neutropenic patients with haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:847–53. doi:10.1038/sj.bmt.1704431.
- [194] Johnson EJ, MacGowan AP, Potter MN, Stockley RJ, White LO, Slade RR, et al. Reduced absorption of oral ciprofloxacin after chemotherapy for haematological malignancy. *J Antimicrob Chemother* 1990;25:837–42.
- [195] Gudiol C, Ayats J, Camoez M, Domínguez MÁ, García-Vidal C, Bodro M, et al. Increase in bloodstream infection due to vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* in cancer patients: risk factors, molecular epidemiology and outcomes. *PLoS One* 2013;8:e74734. doi:10.1371/journal.pone.0074734.
- [196] Gafter-Gvili A, Paul M, Fraser A, Leibovici L. Effect of quinolone prophylaxis in afebrile neutropenic patients on microbial resistance: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:5–22. doi:10.1093/jac/dkl425.
- [197] Gudiol C, Bodro M, Simonetti A, Tubau F, González-Barca E, Cisnal M, et al. Changing aetiology, clinical features, antimicrobial resistance, and outcomes of bloodstream infection in neutropenic cancer patients. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:474–9. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03879.x.
- [198] Weisser M, Oostdijk EA, Willems RJ, Bonten MJ, Frei R, Elzi L, et al. Dynamics of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clones colonizing hospitalized patients: data from a prospective observational study. *BMC Infect Dis* 2012;12:68. doi:10.1186/1471-2334-12-68.
- [199] Tedim AP, Ruiz-Garbajosa P, Rodríguez MC, Rodríguez-Baños M, Lanza VF, Derdoy L, et al. Long-term clonal dynamics of *Enterococcus faecium* strains causing bloodstream infections (1995-2015) in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:48–55. doi:10.1093/jac/dkw366.
- [200] Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–9.
- [201] Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium* 2002;40:1963–71. doi:10.1128/JCM.40.6.1963.
- [202] J. Carletta. Assessing Agreement on Classification Tasks: The Kappa Statistic. *Comput Linguist* 1996;22:249–54.
- [203] Landis JR KG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159–74.
- [204] Woodford N, Tysall L, Auckland C, Stockdale MW, Lawson a. J, Walker R a., et al. Detection of Oxazolidinone-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains by Real-Time PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol* 2002;40:4298–300. doi:10.1128/JCM.40.11.4298-4300.2002.
- [205] Sinclair a., Arnold C, Woodford N. Rapid Detection and Estimation by Pyrosequencing of 23S rRNA Genes with a Single Nucleotide Polymorphism Conferring Linezolid Resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3620–2. doi:10.1128/AAC.47.11.3620-3622.2003.
- [206] Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* 2006;363:83–94. doi:10.1016/j.cccn.2005.04.038.
- [207] Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004;42:4473–9. doi:10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004.
- [208] del Campo R, Tenorio C, Jiménez-Díaz R, Rubio C, Gómez-Lus R, Baquero F, et al. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:905–12. doi:10.1128/AAC.45.3.905-912.2001.
- [209] Cintas LM, Casaus P, Holo H, Hernandez PE, Nes IF, Håvarstein LS. Enterocins L50A and L50B , Two Novel Bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50 , Are Related to Staphylococcal Hemolysins 1998;180:1988–94.

- [210] Frahm E, Obst U. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J Microbiol Methods* 2003;52:123–31. doi:10.1016/S0167-7012(02)00150-1.
- [211] Maheux AF, Bissonnette L, Boissinot M, Bernier J-LT, Huppé V, Bérubé E, et al. Method for rapid and sensitive detection of *Enterococcus* sp. and *Enterococcus faecalis/faecium* cells in potable water samples. *Water Res* 2011;45:2342–54. doi:10.1016/j.watres.2011.01.019.
- [212] Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002;148:257–66.
- [213] Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933;57:571–95.
- [214] Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PAD, Bouvet A. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *int*. *J Syst Evol Microbiol* 2003;53:631–45. doi:10.1099/ijs.0.02361-0.
- [215] Romero B, Morosini MI, Loza E, Rodríguez-Baños M, Navas E, Cantón R, et al. Reidentification of *Streptococcus bovis* isolates causing bacteremia according to the new taxonomy criteria: Still an issue? *J Clin Microbiol* 2011;49:3228–33. doi:10.1128/JCM.00524-11.
- [216] Butt J, Romero-Hernández B, Pérez-Gómez B, Willhauck-Fleckenstein M, Holzinger D, Martin V, et al. Association of *Streptococcus gallolyticus* subspecies *gallolyticus* with colorectal cancer: Serological evidence. *Int J Cancer* 2015. doi:10.1002/ijc.29914.
- [217] Kreikemeyer B, Gámez G, Margarit I, Giard JC, Hammerschmidt S, Hartke A, et al. Genomic organization, structure, regulation and pathogenic role of pilus constituents in major pathogenic Streptococci and Enterococci. *Int J Med Microbiol* 2011;301:240–51. doi:10.1016/j.ijmm.2010.09.003.
- [218] Kupferwasser I, Darius H, Müller AM, Mohr-Kahaly S, Westermeier T, Oelert H, et al. Clinical and morphological characteristics in *Streptococcus bovis* endocarditis: a comparison with other causative microorganisms in 177 cases. *Heart* 1998;80:276–80.
- [219] Durante-Mangoni E, Bradley S, Selton-Suty C, Tripodi M-F, Barsic B, Bouza E, et al. Current features of infective endocarditis in elderly patients: results of the International Collaboration on Endocarditis Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med* 2008;168:2095–103. doi:10.1001/archinte.168.19.2095.
- [220] McCOY WC, MASON JM. Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. *J Med Assoc State Ala* 1951;21:162–6.
- [221] Zarkin BA, Lillemoe KD, Cameron JL, Effron PN, Magnuson TH, Pitt HA. The triad of *Streptococcus bovis* bacteremia, colonic pathology, and liver disease. *Ann Surg* 1990;211:786-91-2.
- [222] Fernández-Hidalgo N, Tornos Mas P. Epidemiology of Infective Endocarditis in Spain in the Last 20 Years. *Rev Española Cardiol (English Ed)* 2013;66:728–33. doi:10.1016/j.rec.2013.05.002.
- [223] Pant S, Patel NJ, Deshmukh A, Golwala H, Patel N, Badheka A, et al. Trends in Infective Endocarditis Incidence, Microbiology, and Valve Replacement in the United States From 2000 to 2011. *J Am Coll Cardiol* 2015;65:2070–6. doi:10.1016/j.jacc.2015.03.518.
- [224] Dayer MJ, Jones S, Prendergast B, Baddour LM, Lockhart PB, Thornhill MH. Incidence of infective endocarditis in England, 2000–13: a secular trend, interrupted time-series analysis. *Lancet* 2015;385:1219–28. doi:10.1016/S0140-6736(14)62007-9.
- [225] Moreillon P, Que Y-A. Infective endocarditis. *Lancet* 2004;363:139–49. doi:10.1016/S0140-6736(03)15266-X.
- [226] Corredoira JC, Alonso MP, García JF, Casariego E, Coira A, Rodríguez A, et al. Clinical characteristics and significance of *Streptococcus salivarius* bacteremia and k bacteremia: a prospective 16-year study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:250–5. doi:10.1007/s10096-005-1314-x.
- [227] Hoen B, Alla F, Selton-Suty C, Béguinot I, Bouvet A, Briançon S, et al. Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France. *JAMA* 2002;288:75–81.
- [228] Giannitsioti E, Chirouze C, Bouvet A, Béguinot I, Delahaye F, Mainardi J-L, et al. Characteristics and regional variations of group D streptococcal endocarditis in France. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:770–6. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01753.x.

- [229] Gupta A, Madani R, Mukhtar H. *Streptococcus bovis* endocarditis, a silent sign for colonic tumour. *Color Dis* 2010;12:164–71. doi:10.1111/j.1463-1318.2009.01814.x.
- [230] Boleij A, Muytjens CMJ, Bukhari SI, Cayet N, Glaser P, Hermans PWM, et al. Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp *gallolyticus* with colorectal cancer. *J Infect Dis* 2011;203:1101–9. doi:10.1093/infdis/jiq169.
- [231] Paul M, Gafter-Gvili A, Leibovici L, Bishara J, Levy I, Yaniv I, et al. The epidemiology of bacteremia with febrile neutropenia: experience from a single center, 1988-2004. *Isr Med Assoc J* 2007;9:424–9.
- [232] Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2012;55:905–14. doi:10.1093/cid/cis580.
- [233] Balzan S, Quadros CDA, Cleve R De, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact 2007;22:464–71. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.04933.x.
- [234] Balkovetz DF, Katz J. Bacterial invasion by a paracellular route: divide and conquer. *Microbes Infect* 2003;5:613–9.
- [235] Zeng J, Teng F, Murray BE. Gelatinase is important for translocation of *Enterococcus faecalis* across polarized human enterocyte-like T84 cells. *Infect Immun* 2005;73:1606–12. doi:10.1128/IAI.73.3.1606-1612.2005.
- [236] Smetanová L, Stětinová V, Svoboda Z, Kvetina J. Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2011;54:3–8.
- [237] Danne C, Entenza JM, Mallet A, Briandet R, Débarbouillé M, Nato F, et al. Molecular characterization of a *Streptococcus gallolyticus* genomic island encoding a pilus involved in endocarditis. *J Infect Dis* 2011;204:1960–70. doi:10.1093/infdis/jir666.
- [238] Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:533–40. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03213.x.
- [239] Ramadhan AA, Hegedus E. Biofilm formation and esp gene carriage in enterococci. *J Clin Pathol* 2005;58:685–6. doi:10.1136/jcp.2004.024109.
- [240] Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;256:145–50. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00112.x.
- [241] Baldassarri L, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Montanaro L, Rosa D, et al. *Enterococcus* spp . produces slime and survives in rat peritoneal macrophages 2001:113–20. doi:10.1007/s00430-001-0096-8.
- [242] Kempf I, Hellard G, Perrin-Guyomard A, Gicquel-Bruneau M, Sanders P, Leclercq R. Prevalence of high-level vancomycin-resistant enterococci in French broilers and pigs. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:463–4. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.04.029.
- [243] Bager F, Aarestrup FM, Madsen M, Wegener HC. Glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from broilers and pigs following discontinued use of avoparcin. *Microb Drug Resist* 1999;5:53–6. doi:10.1089/mdr.1999.5.53.
- [244] European Centre for Disease Prevention and Control. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. Stockholm: 2016.
- [245] Arthur M, Quintiliani R. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:375–81.
- [246] Evers S, Courvalin P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol* 1996;178:1302–9.
- [247] Sherman JM. THE STREPTOCOCCI. *Bacteriol Rev* 1937;1:3–97.
- [248] Tacconelli E, Cataldo MA. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:99–106. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.08.026.
- [249] Vollaard EJ, Clasener HA. Colonization resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:409–14.
- [250] Porwancher R, Sheth A, Remphrey S, Taylor E, Hinkle C, Zervos M. Epidemiological study of hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: possible transmission by an electronic ear-probe thermometer. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:771–3.
- [251] Humphreys H. Controlling the spread of vancomycin-resistant enterococci. Is active screening worthwhile? *J Hosp Infect* 2014;88:191–8. doi:10.1016/j.jhin.2014.09.002.

- [252] Boyce JM, Potter-Bynoe G, Chenevert C, King T, Jarvis WR, Boyce JM, et al. Environmental Contamination Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Possible Infection Control Implications. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:622–7. doi:10.1086/502213.
- [253] Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. Recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR Recomm Reports Morb Mortal Wkly Report Recomm Reports* 1995;44:1–13.
- [254] Malhotra-Kumar S, Haccuria K, Michiels M, Ieven M, Poyart C, Hryniewicz W, et al. Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant enterococcus species. *J Clin Microbiol* 2008;46:1577–87. doi:10.1128/JCM.00326-08.
- [255] Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:5857–60. doi:10.1128/JCM.42.12.5857-5860.2004.
- [256] Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 1995;226:235–40. doi:10.1006/abio.1995.1220.
- [257] Woodford N, Adebiyi AM, Palepou MF, Cookson BD. Diversity of VanA glycopeptide resistance elements in enterococci from humans and nonhuman sources. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:502–8.
- [258] Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, Sundsfjord A. Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1105–10.
- [259] Kawalec M, Gniadkowski M, Hryniewicz W. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a hospital in Gdask, Poland, due to horizontal transfer of different Tn1546-like transposon variants and clonal spread of several strains. *J Clin Microbiol* 2000;38:3317–22.
- [260] Feld R. Bloodstream infections in cancer patients with febrile neutropenia. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32 Suppl 1:S30-3. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.06.017.
- [261] Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest* 2010;120:4332–41. doi:10.1172/JCI43918.
- [262] Ford CD, Lopansri BK, Haydoura S, Snow G, Dascomb KK, Asch J, et al. Frequency, risk factors, and outcomes of vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization and infection in patients with newly diagnosed acute leukemia: different patterns in patients with acute myelogenous and acute lymphoblastic leukemia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2015;36:47–53. doi:10.1017/ice.2014.3.
- [263] Almyroutis NG, Lesse AJ, Hahn T, Samonis G, Hazamy PA, Wongkittiroch K, et al. Molecular Epidemiology and Risk Factors for Colonization by Vancomycin-Resistant *Enterococcus* in Patients with Hematologic Malignancies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011;32:490–6. doi:10.1086/659408.
- [264] Hufnagel M, Liese C, Loescher C, Kunze M, Proempeler H, Berner R, et al. Enterococcal colonization of infants in a neonatal intensive care unit: associated predictors, risk factors and seasonal patterns. *BMC Infect Dis* 2007;7:107. doi:10.1186/1471-2334-7-107.
- [265] Hållgren A, Burman LG, Isaksson B, Olsson-Liljeqvist B, Nilsson LE, Saeedi B, et al. Rectal colonization and frequency of enterococcal cross-transmission among prolonged-stay patients in two Swedish intensive care units. *Scand J Infect Dis* 2005;37:561–71.
- [266] D'Agata EMC, Horn MA, Webb GF. The impact of persistent gastrointestinal colonization on the transmission dynamics of vancomycin-resistant enterococci. *J Infect Dis* 2002;185:766–73. doi:10.1086/339293.
- [267] Ruiz-Garbajosa P, del Campo R, Coque TM, Asensio A, Bonten M, Willems R, et al. Longer intestinal persistence of *Enterococcus faecalis* compared to *Enterococcus faecium* clones in intensive-care-unit patients. *J Clin Microbiol* 2009;47:345–51. doi:10.1128/JCM.01597-08.
- [268] Van den Berghe E, De Winter T, De Vuyst L. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *Int J Food Microbiol* 2006;107:159–70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.027.
- [269] Teixeira LM, Facklam RR, Steigerwalt AG, Pigott NE, Merquior VL, Brenner DJ. Correlation between phenotypic characteristics and DNA relatedness within *Enterococcus faecium* strains. *J Clin Microbiol* 1995;33:1520–3.
- [270] van Vliet MJ, Tissing WJE, Dun C a J, Meessen NEL, Kamps W a, de Bont ESJM, et al. Chemotherapy treatment in pediatric patients with acute myeloid leukemia receiving

- antimicrobial prophylaxis leads to a relative increase of colonization with potentially pathogenic bacteria in the gut. *Clin Infect Dis* 2009;49:262–70. doi:10.1086/599346.
- [271] Suppola JP, Volin L, Valtonen V V. Overgrowth of *Enterococcus faecium* in the Feces of Patients with Hematologic Malignancies 2013;694–7.
- [272] Ruiz-Garbajosa P, de Regt M, Bonten M, Baquero F, Coque TM, Cantón R, et al. High-density fecal *Enterococcus faecium* colonization in hospitalized patients is associated with the presence of the polyclonal subcluster CC17. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:519–22. doi:10.1007/s10096-011-1342-7.
- [273] Top J, Willems R, Blok H, de Regt M, Jalink K, Troelstra A, et al. Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:316–9. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01631.x.
- [274] Bourgeois-Nicolaos N, Nguyen TT, Defrance G, Massias L, Alavoine L, Lefort A, et al. The emergence of linezolid resistance among Enterococci in intestinal microbiota of treated patients is unrelated to individual pharmacokinetic characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:2681–7. doi:10.1128/AAC.02251-13.
- [275] Lode H, Von der Höh N, Ziege S, Borner K, Nord CE. Ecological effects of linezolid *versus* amoxicillin/clavulanic acid on the normal intestinal microflora. *Scand J Infect Dis* 2001;33:899–903.
- [276] Montassier E, Batard E, Gastinne T, Potel G, de La Cochetière MF. Recent changes in bacteremia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:841–50. doi:10.1007/s10096-013-1819-7.
- [277] Klastersky J, Ameye L, Maertens J, Georgala A, Muanza F, Aoun M, et al. Bacteraemia in febrile neutropenic cancer patients. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30:51–9. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.06.012.
- [278] Lopes LAA, Veroneze I, Burgardt CI, Niebel Stier CJ. Prophylaxis with levofloxacin: impact on bacterial susceptibility and epidemiology in a hematopoietic stem cell transplant unit. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2014;36:35–42. doi:10.5581/1516-8484.20140011.
- [279] Carratala J, Fernandez-Sevilla A, Tubau F, Dominguez MA, Gudiol F. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in fecal flora of cancer patients receiving norfloxacin prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:503–5.
- [280] Garnica M, Nouér S a, Pellegrino FLPC, Moreira BM, Maiolino A, Nucci M. Ciprofloxacin prophylaxis in high risk neutropenic patients: effects on outcomes, antimicrobial therapy and resistance. *BMC Infect Dis* 2013;13:356. doi:10.1186/1471-2334-13-356.
- [281] Villafuerte-Gutierrez P, Villalon L, Losa JE, Henriquez-Camacho C. Treatment of febrile neutropenia and prophylaxis in hematologic malignancies: a critical review and update. *Adv Hematol* 2014;2014:986938. doi:10.1155/2014/986938.
- [282] Gomez L, Garau J, Estrada C, Marquez M, Dalmau D, Xercavins M, et al. Ciprofloxacin prophylaxis in patients with acute leukemia and granulocytopenia in an area with a high prevalence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *Cancer* 2003;97:419–24. doi:10.1002/cncr.11044.
- [283] Coque TM, Willems RJL, Fortún J, Top J, Diz S, Loza E, et al. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance? *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2693–700. doi:10.1128/AAC.49.7.2693-2700.2005.
- [284] Fortún J, Coque TM, Martín-Dávila P, Moreno L, Cantón R, Loza E, et al. Risk factors associated with ampicillin resistance in patients with bacteraemia caused by *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:1003–9.
- [285] Chong Y, Yakushiji H, Ito Y, Kamimura T. Clinical impact of fluoroquinolone prophylaxis in neutropenic patients with hematological malignancies. *Int J Infect Dis* 2011;15:e277–81. doi:10.1016/j.ijid.2010.12.010.
- [286] Kühn I, Burman LG, Haeggman S, Tullus K, Murray BE. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. *J Clin Microbiol* 1995;33:2812–7.
- [287] SAEEDI B, TARNBERG M, GILL H, HALLGREN A, JONASSON J, NILSSON LE, et al. Phene Plate (PhP) biochemical fingerprinting. A screening method for epidemiological typing of enterococcal isolates? *APMIS* 2005;113:603–12. doi:10.1111/j.1600-0463.2005.apm\_217.x.
- [288] Kühn I, Iversen A, Burman LG, Olsson-Liljequist B, Franklin A, Finn M, et al. Comparison of enterococcal populations in

- animals, humans, and the environment--a European study. *Int J Food Microbiol* 2003;88:133–45.
- [289] Boleij A, Tjalsma H. The itinerary of *Streptococcus gallolyticus* infection in patients with colonic malignant disease. *Lancet Infect Dis* 2013;13:719–24. doi:10.1016/S1473-3099(13)70107-5.
- [290] van Vliet MJ, Harmsen HJM, de Bont ESJM, Tissing WJE. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000879. doi:10.1371/journal.ppat.1000879.
- [291] Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *J Lab Autom* 2015;20:107–26. doi:10.1177/2211068214561025.
- [292] Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer R-JM, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:851–9. doi:10.1152/ajpgi.00327.2009.
- [293] Vollmer T, Hinse D, Kleesiek K, Dreier J. Interactions between endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates and human endothelial cells 2010.
- [294] Romero-Hernández B, Tedim AP, Sánchez-Herrero JF, Librado P, Rozas J, Muñoz G, et al. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* from human and animal origins: genetic diversity, antimicrobial susceptibility, and characterization of a vancomycin-resistant calf isolate carrying a vanA-Tn1546-like element. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:2006–15. doi:10.1128/AAC.04083-14.
- [295] Pinholt M, Larner-Svensson H, Littauer P, Moser CE, Pedersen M, Lemming LE, et al. Multiple hospital outbreaks of vanA *Enterococcus faecium* in Denmark, 2012–13, investigated by WGS, MLST and PFGE. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:2474–82. doi:10.1093/jac/dkv142.
- [296] Park SY, Kang J-H, Kim J-H, Kim SB, Kim S-Y, Park YS, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak caused by patient transfer in 2 separate intensive care units. *Am J Infect Control* 2012;40:565–7. doi:10.1016/j.ajic.2011.07.006.
- [297] Sivertsen A, Billström H, Melefors Ö, Liljequist BO, Wisell KT, Ullberg M, et al. A Multicentre Hospital Outbreak in Sweden Caused by Introduction of a vanB2 Transposon into a Stably Maintained pRUM-Plasmid in an *Enterococcus faecium* ST192 Clone. *PLoS One* 2014;9:e103274. doi:10.1371/journal.pone.0103274.
- [298] Marcade G, Micol J-B, Jacquier H, Raskine L, Donay J-L, Nicolas-Viaud S, et al. Outbreak in a haematology unit involving an unusual strain of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* carrying both vanA and vanB genes. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:500–5. doi:10.1093/jac/dkt376.
- [299] Henard S, Lozniewski A, Aissa N, Jouzeau N, Rabaud C. Evaluation of the duration of vanA vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* carriage and clearance during a large-scale outbreak in a region of eastern France. *Am J Infect Control* 2011;39:169–71. doi:10.1016/j.ajic.2010.07.003.
- [300] Valdezate S, Miranda C, Navarro A, Freitas AR, Cabrera JJ, Carrasco G, et al. Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant *Enterococcus faecium* harbouring an Inc18-like::Tn1546 plasmid in a haemo-oncology ward of a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:832–6. doi:10.1093/jac/dkr545.
- [301] Todokoro D, Tomita H, Inoue T, Ike Y. Genetic analysis of bacteriocin 43 of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:6955–64. doi:10.1128/AEM.00934-06.
- [302] Stropfová V, Lauková A, Simonová M, Marciňáková M. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Vet Microbiol* 2008;132:293–301. doi:10.1016/j.vetmic.2008.05.001.
- [303] Freitas AR, Tedim AP, Francia M V, Jensen LB, Novais C, Peixe L, et al. Multilevel population genetic analysis of vanA and vanB *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012). *J Antimicrob Chemother* 2016;71:3351–66. doi:10.1093/jac/dkw312.
- [304] Bonten MJ, Slaughter S, Ambergen AW, Hayden MK, van Voorhis J, Nathan C, et al. The role of “colonization pressure” in the spread of vancomycin-resistant enterococci: an important infection control variable. *Arch Intern Med* 1998;158:1127–32.
- [305] Hayden MK. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 2000;31:1058–65. doi:10.1086/318126.
- [306] Lane HJ, Blum N, Fee E. Oliver Wendell Holmes (1809-1894) and Ignaz Philipp



- Semmelweis (1818-1865): preventing the transmission of puerperal fever. *Am J Public Health* 2010;100:1008–9. doi:10.2105/AJPH.2009.185363.
- [307] Loudon I. Semmelweis and his thesis. *J R Soc Med* 2005;98:555. doi:10.1258/jrsm.98.12.555.
- [308] Pittet D, Allegranzi B, Sax H, Dharan S, Pessoa-Silva CL, Donaldson L, et al. Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *Lancet Infect Dis* 2006;6:641–52. doi:10.1016/S1473-3099(06)70600-4.
- [309] Erasmus V, Daha TJ, Brug H, Richardus JH, Behrendt MD, Vos MC, et al. Systematic review of studies on compliance with hand hygiene guidelines in hospital care. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:283–94. doi:10.1086/650451.
- [310] Girou E, Loyeau S, Legrand P, Oppein F, Brun-Buisson C. Efficacy of handrubbing with alcohol based solution versus standard handwashing with antiseptic soap: randomised clinical trial. *BMJ* 2002;325:362.
- [311] Edmonds SL, Macinga DR, Mays-Suko P, Duley C, Rutter J, Jarvis WR, et al. Comparative efficacy of commercially available alcohol-based hand rubs and World Health Organization-recommended hand rubs: formulation matters. *Am J Infect Control* 2012;40:521–5. doi:10.1016/j.ajic.2011.08.016.
- [312] Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:244–53. doi:10.1038/nrmicro2537.
- [313] Zeeuwen PLJM, Boekhorst J, van den Bogaard EH, de Koning HD, van de Kerkhof PMC, Saulnier DM, et al. Microbiome dynamics of human epidermis following skin barrier disruption. *Genome Biol* 2012;13:R101. doi:10.1186/gb-2012-13-11-r101.
- [314] Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17994–9. doi:10.1073/pnas.0807920105.
- [315] del Campo R, Sánchez-Díaz AM, Zamora J, Torres C, Cintas LM, Franco E, et al. Individual variability in finger-to-finger transmission efficiency of *Enterococcus faecium* clones. *Microbiologyopen* 2014;3:128–32. doi:10.1002/mbo3.156.







**ANEXO**

---



# The rise of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* high-risk clones as a frequent intestinal colonizer in oncohaematological neutropenic patients on levofloxacin prophylaxis: a risk for bacteraemia?

A. M. Sánchez-Díaz<sup>1,2</sup>, C. Cuartero<sup>1</sup>, J. D. Rodríguez<sup>3</sup>, S. Lozano<sup>3</sup>, J. M. Alonso<sup>3</sup>, M. Rodríguez-Domínguez<sup>1,2</sup>, A. P. Tedim<sup>1</sup>, R. del Campo<sup>1,2</sup>, J. López<sup>3</sup>, R. Cantón<sup>1,2</sup> and P. Ruiz-Garbajosa<sup>1,2</sup>

1) Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), 2) Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) and 3) Servicio de Hematología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, 28034 Madrid, Spain

## Abstract

Levofloxacin extended prophylaxis (LEP), recommended in oncohaematological neutropenic patients to reduce infections, might select resistant bacteria in the intestine acting as a source of endogenous infection. In a prospective observational study we evaluated intestinal emergence and persistence of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* (AREfm), a marker of hospital adapted high-risk clones. AREfm was recovered from the faeces of 52 patients with prolonged neutropenia after chemotherapy, at admission (Basal), during LEP, and twice weekly until discharge (Pos-LEP). Antibiotic susceptibility, virulence traits and population structure (pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing) were determined and compared with bacteraemic isolates. Gut enterococcal population was monitored using a quantitative PCR quantification approach. AREfm colonized 61.4% of patients (194/482 faecal samples). Sequential AREfm acquisition (25% Basal, 36.5% LEP, 50% Pos-LEP) and high persistent colonization rates (76.9–89.5%) associated with a decrease in clonal diversity were demonstrated. Isolates were clustered into 24 PFGE-patterns within 13 sequence types, 95.8% of them belonging to hospital-associated Bayesian analysis of population structure subgroups 2.1a and 3.3a. Levofloxacin resistance and high-level streptomycin resistance were a common trait of these high-risk clones. AREfm-ST117, the most persistent clone, was dominant (60.0% isolates, 32.6% patients). It presented *esp* gene and caused 18.2% of all bacteraemia episodes in 21% of patients previously colonized by this clone. In AREfm-colonized patients, intestinal enrichment in the *E. faecium* population with a decline in total bacterial load was observed. AREfm intestinal colonization increases during hospital stay and coincides with enterococci population enrichment in the gut. Dominance and intestinal persistence of the ST117 clone might increase the risk of bacteraemia.

Clinical Microbiology and Infection © 2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Bacteraemia, colonization, *Enterococcus faecium*, fecal carriage, levofloxacin prophylaxis, neutropenic patients

**Original Submission:** 19 March 2015; **Revised Submission:** 8 July 2015; **Accepted:** 19 August 2015

Editor: L. Poirel

**Article published online:** 29 August 2015

**Corresponding author:** R. Cantón, Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, 28034 Madrid, Spain  
**E-mail:** [rafael.canton@salud.madrid.org](mailto:rafael.canton@salud.madrid.org)

## Introduction

In neutropenic oncohaematological patients, chemotherapy-induced neutropenia is of concern because its duration and severity are narrowly related to the development of infection.

Moreover, bacteraemia constitutes the most frequent cause of infection-related mortality, which occurs in 20–40% of febrile neutropenic patients [1]. To reduce the risk of infection, different antibiotic-based prophylaxis regimens, such as co-trimoxazole, cephalosporins or fluoroquinolones, have been assayed [2,3]. Levofloxacin-extended prophylaxis is now widely recommended as an infection prevention strategy for high-risk patients (those with prolonged neutropenia, >7 days and neutrophil counts  $\leq 100/\text{mm}^3$  and/or substantial concurrent comorbidity) [4]. Levofloxacin administration has been associated with reductions of documented infections in febrile neutropenia episodes due to

either Gram-positive or Gram-negative bacteria [5,6] and with higher survival rates [7,8]. Despite these advantages, extended prophylaxis with fluoroquinolones has not become a standard of care in these patients and its role remains uncertain. Intestinal colonization by fluoroquinolone-resistant organisms as well as a global increase in fluoroquinolone-resistance rates are some of the main drawbacks reported [5,6].

In recent years, *Enterococcus* spp. bacteraemic episodes, mainly due to *Enterococcus faecium*, have risen markedly in neutropenic patients with haematological malignancies worldwide [2,9,10]. This increase coincides with the emergence and spread of a genetic subpopulation of a multidrug-resistant *E. faecium* in hospitals, characterized by its resistance to antibiotics such as ampicillin, quinolones and, occasionally, vancomycin and by harbouring putative virulence genes [11]. Most of these hospital-adapted clones, formerly included in clonal complex 17 (CC17), have been clustered by Bayesian analysis of population structure (BAPS) into subgroups 2.1a and 3.3a and are considered high-risk clones [12,13]. Despite the growing evidence of *E. faecium* infections in these patients, few studies have focused on the colonization dynamics of this organism. Consequently our main objectives were to prospectively study and describe the colonization dynamics of ampicillin-resistant *E. faecium* (AREfm) as a marker of hospital-adapted high-risk clones. Second, we aimed to investigate the main variables influencing this colonization and to describe AREfm bacteraemic episodes and their relation to previous AREfm intestinal colonization in a cohort of oncohaematological patients receiving levofloxacin prophylaxis.

## Materials and methods

### Study design, patients and definitions

A prospective observational study was conducted (July 2009 to July 2012) at Ramón y Cajal University Hospital (Madrid, Spain). During this period, all oncohaematological adult patients admitted consecutively to hospital who were expected to develop a prolonged (>7 days) post-chemotherapy neutropenia were recruited. Oral levofloxacin extended prophylaxis (LEP) was administered daily (500 mg/24 h) from admission and while receiving cytostatic chemotherapy. Co-trimoxazole prophylaxis (160/800 mg once a day) was added to LEP in patients receiving haematopoietic stem cell transplantation as a pre-transplant conditioning. LEP was withdrawn when patients developed febrile neutropenia to administer broad-spectrum antibiotics. If patients remained afebrile but neutropenic, LEP was maintained until recovery from neutropenia. Demographic and clinical data were extracted from clinical files.

From each patient faecal samples were collected: (i) one sample before LEP (Basal), from admission or recovery from a

previous neutropenia until start of chemotherapy and LEP, (ii) twice weekly during LEP, and (iii) twice weekly during the post-prophylaxis period (Pos-LEP), from LEP withdrawal until recovery from neutropenia or discharge. In addition, blood cultures were monitored and *E. faecium*-positive blood cultures were also recovered and characterized. The study was approved by the Clinical Research Ethical Committee (CEIC-106/09) and all patients included signed an informed consent form.

The following definitions were used: a *neutropenic episode* was defined as the hospitalization period where a patient underwent intensive chemotherapy and subsequently developed neutropenia. We referred to the *first neutropenic episode* as the first episode registered after inclusion in the study regardless of the disease stage or previous chemotherapy cycles. *Colonization* was considered when AREfm was detected in at least one stool sample; *acquisition of colonization* was defined as the time when AREfm colonization was first detected >48 h after hospital admission; and *AREfm persistent colonization* was defined as detection of AREfm in at least two follow-up faecal samples.

### Microbiology studies

For AREfm screening, 0.05 g of each sample was suspended in 1 mL of sterile saline solution and 0.1-mL aliquots were plated onto m-*Enterococcus* agar (Difco; BD, Detroit, MI, USA) supplemented with ampicillin (10 mg/L). Isolates recovered from selective media were identified by mass spectrometry (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; Bruker-Daltonics, GmbH, Germany) and susceptibility testing was performed by a commercial automated microdilution method (MicroScan, Beckman, Sacramento, CA, USA) following 2014 EUCAST criteria (<http://www.eucast.org/>). EUCAST epidemiological cut-off values (ECOFF) were used for levofloxacin and erythromycin.

### Clonal relatedness and genetic diversity

AREfm clonal relationship was established by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Macrorestriction patterns were interpreted according to the criteria proposed by Tenover *et al.* [14]. One representative strain of each PFGE pattern was further studied by multilocus sequence typing (<http://efaecium.mlst.net/>). Simpson's index of diversity was used to quantify AREfm clones diversity in each sub-period of the study. The Simpson's index of diversity takes into account the number of different clones (PFGE-types) in relation to the total number of isolates and it was calculated as previously described [15].

### Virulence determinants and bacteriocin production

Virulence determinants; *esp* (enterococcal surface protein), *hyl* (glycoside hydrolase) and *acm* (collagen adhesin) genes, were

detected by PCR in a representative clone per patient [16,17]. Bacteriocin production was tested as previously described [18] using *E. faecium* JH2-2 and *E. faecalis* 228 isolates as bacteriocin-producer controls.

### Quantitative TaqMan PCR

A randomized subgroup of AREfm-colonized ( $n = 9$ ) and not colonized ( $n = 11$ ) patients, were selected to monitor the evolution of *E. faecium* bacterial load and to compare it both with *Enterococcus* spp. and with the global intestinal bacterial load. AREfm colonization status was defined as the isolation of AREfm in at least one sample during the follow-up period regardless of the basal colonization status. Three faecal samples corresponding to the first sample collected at Basal, LEP and Pos-LEP of the first neutropenic episode were selected per patient. Total DNA was extracted from 0.5 g of faeces using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The relative abundance of total bacteria, *Enterococcus* spp. and *E. faecium* was determined by amplifying target sequences in 16S rDNA, 23S rDNA and *ddl* genes respectively [19–21]. RNase P gene (TaqMan RNase P Control Reagents; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was amplified and used as a normalizer of quantification. Relative quantification was performed applying the Livak method ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) and expressed as the ratio of the relative amount of the target templates in LEP and Pos-LEP samples referred to the basal sample. PCR were performed in triplicate on an ABI Prism FAST-7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

### Statistical analysis

Data were analysed employing STATA™ software version 11.0 (StataCorp LP, College Station, TX, USA). Chi-squared or the Fisher exact test was performed for qualitative variables to test the association between demographic and clinical variables and AREfm colonization. To compare mean values or ranks, the independent samples Student's *t*-test or the Mann–Whitney *U* test were used, respectively. Significance level was established at 0.05 unless multiple tests on the same variables were performed, and then we lowered the significance level to 0.025 (Bonferroni correction). McNemar test was used to compare colonization rates between periods (Pre versus LEP and Pre versus Pos-LEP).

## Results

### Characteristics of patients

During the study period 113 patients were recruited and signed the informed consent, whereas 50 did not consent. Of patients enrolled, 30 lacked a basal faecal sample, 27 missed follow up and four received a  $\beta$ -lactam antibiotic during LEP. In the end, 52 oncohaematological patients (mean age  $47 \pm 15.6$ ; 30 male)

who presented 63 neutropenic episodes were included in the study. Only 8 of 52 patients developed two or more neutropenic episodes. More than half of the patients (55.7%, 29/52) had been hospitalized in the previous month. Patients' characteristics and clinical features are shown in Table 1.

During the follow-up, 22 episodes of bacteraemia were microbiologically documented in 7.7% of all patients, being AREfm, the third more common cause of bacteraemia ( $n = 4$ , 18.2%). These episodes occurred in 12.5% of the AREfm-colonized patients, although no statistically significant association was found (Fisher's exact test,  $p = 0.151$ ). AREfm bacteraemic episodes occurred at the Pos-LEP stage after the administration of remission–induction chemotherapy and were, in all cases, due to the same clone found colonizing the intestine of the patient. AREfm bacteraemic episodes occurred after  $29.5 \pm 12$  days of the first isolation of that clone in the gut.

### AREfm colonization dynamics and risk factors for colonization

AREfm colonization was detected in 61.4% (32/52) patients at any time during the study. The AREfm colonization rate increased gradually from 25% (13/52) at Basal to 36.6% (19/52) at LEP and to 50% (26/52) during Pos-LEP (Pre-Pos-LEP, McNemar,  $p = 0.004$ ) when analysing patient's first neutropenia episode. It is noteworthy that 61.5% (8/13) of the patients with AREfm detection at basal stage corresponded to those with previous hospital admissions. These rates were much higher, if subsequent neutropenic episodes were considered (Fig. 1a). Persistence of AREfm colonization was a common feature in colonized patients (78.1%, 25/32) and it is shown in Fig. 1(b).

**TABLE 1.** Clinical and demographic features of the patients and neutropenic episodes studied

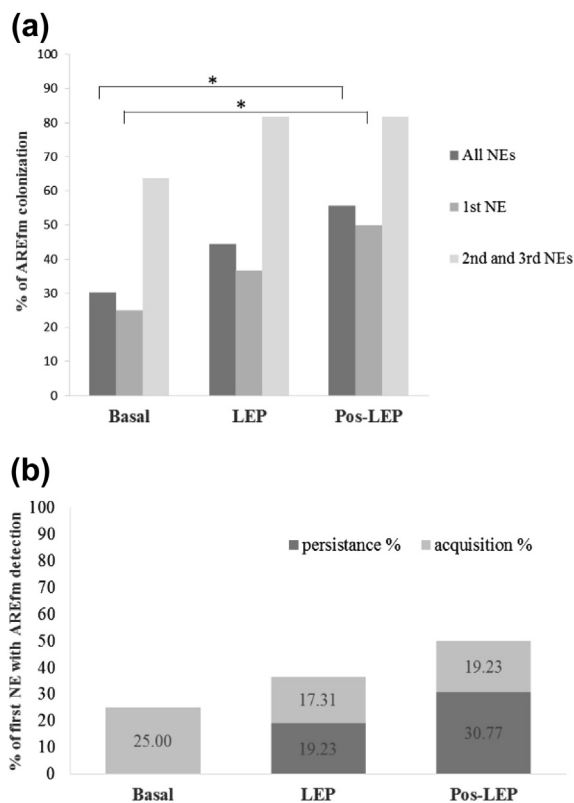
Feature	Value
No. of patients	52
Mean age (SD)	47 (15.6)
Gender: male/female, <i>n</i> .	30/22
Haematological disease, <i>n</i> .	
Acute myelogenous leukaemia	27
Acute lymphoblastic leukaemia	5
Non-Hodgkin lymphoma	6
Multiple myeloma	7
Hodgkin lymphoma	4
Others <sup>a</sup>	3
No. of patients receiving HCT <sup>b</sup>	31
No. of NEs	63
No. of first NEs	52
No. of patients with $\geq 2$ NEs	11
Mean no. of NEs per patient	1.2
Days studied per NE (median, range)	39 (8–96)
Days in neutropenia (median, range)	15 (9–26)
Days under LEP (median, range)	11 (9–15)
No of faeces samples processed	482
No of faeces samples per NE (median, range)	7 (5–9)
Blood cultures per admission (median, range)	7 (3–11)

Abbreviations: HCT, haematopoietic stem cell transplantation; LEP, levofloxacin extended prophylaxis; NE neutropenic episode.

<sup>a</sup>This includes one patient each suffering from myelofibrosis, biphenotypic acute leukaemia and chronic myelogenous leukaemia.

<sup>b</sup>All these patients received co-trimoxazole prophylaxis along with LEP.





**FIG. 1.** (a) Ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* (AREfm) colonization rates per neutropenic episode (NEs) before prophylaxis administration (Basal), during levofloxacin extended prophylaxis (LEP) and after LEP discontinuation; (b) acquisition and persistence rates of AREfm during first NEs in the different study sub-periods, \* $p < 0.025$ .

Exploratory analysis revealed the duration of neutropenia, mucositis and chemotherapy phase as independent risk factors for AREfm colonization during the first neutropenic episode at Pos-LEP (Table 2). Despite the lack of statistical significance, patients receiving co-trimoxazole prophylaxis together with LEP showed lower AREfm colonization rates than those receiving LEP alone (50% versus 78%).

#### AREfm clonal relationship and diversity

All AREfm isolates ( $n = 194$ ) clustered into 24 PFGE patterns and 13 sequence types (STs) (Table 3). Nearly half of these STs (6/13), grouping 186 isolates (95.8%), were clustered into BAPS subgroups 2.1a and 3.3a which are high-risk clones related to hospital acquisition [12,13]. AREfm-ST117 (BAPS 2.1a), associated with PFGE patterns B, E and N, was the most frequent clone detected (35.6% of the patients). Additionally, all AREfm bacteraemic episodes ( $n = 4$ ) corresponded to ST117 (PFGE-types B and N) and were the same as those found in the faecal samples of these patients.

AREfm-ST17 (BAPS 3.3a) was identified in 21% of patients and showed a high variability in PFGE patterns (D, G, H, O, Q, T and U). The remaining clones were just sporadically identified over the follow-up period (Table 3).

A change in colonization dynamics was observed during the study period. During 2009 and 2010, the predominant clone was AREfm-ST117 whereas from 2011 an ecological switch to AREfm-ST17 was observed. Moreover, a clear reduction of the clonal diversity was detected with Simpson's index of diversity values of 0.92 at Basal, 0.87 at LEP and 0.76 at Pos-LEP. This observation was consistent with the persistence of some

**TABLE 2.** Statistical association of clinical and demographic variables to patient colonization ( $n = 52$ ) by ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* during LEP period and after it discontinuation (Pos-LEP)

Independent variable	Dependent variable: Patient's AREfm colonization at:					
	LEP			Pos-LEP		
	Colonized ( $n = 19$ )	Non-colonized ( $n = 33$ )	$p$	Colonized ( $n = 26$ )	Non-colonized ( $n = 26$ )	$p$
Gender (male), $n$ (%)	12 (40)	18 (60)	0.366	16 (53.3)	14 (46.7)	0.623
Age (years), mean (SD)	50.1 (14.8)	46 (16)	0.36	47.3 (16.5)	47 (14.9)	0.912
Prior admissions, $n$ (%)	13 (44.8)	16 (55.2)	0.154	NA	NA	
Duration of hospitalization (days), median (range)	NA	NA		52 (27–84)	34 (26–36)	0.056
Chemotherapy phase (induction), $n$ (%)	6 (37.5)	10 (62.5)	0.194	10 (62.5)	6 (37.5)	0.024*
Cytarabine chemotherapy, $n$ (%)	7 (28)	18 (72)	0.219	12 (48)	13 (52)	0.781
Mucositis (yes), $n$ (%)	11 (32.4)	23 (67.6)	0.389	13 (38.2)	21 (61.8)	0.02*
Co-trimoxazole prophylaxis, $n$ (%)	8 (26.6)	22 (73.3)	0.084	NA	NA	
Duration of LEP (days), median (range)	14 (6–21)	11 (9–15)	0.248	11.5 (6–20)	11 (10–15)	0.883
Febrile neutropenia (yes), $n$ (%)	NA	NA		21 (46.6)	24 (53.4)	0.315
Duration of neutropenia (days), median (range)	NA	NA		18.5 (9–26)	10 (8–17)	0.018*
Administration of broad spectrum antibiotics:						
Meropenem, $n$ (%)	NA	NA		17 (47.2)	19 (52.8)	0.548
Vancomycin, $n$ (%)	NA	NA		12 (40)	18 (60)	0.092
Amikacin, $n$ (%)	NA	NA		10 (58.8)	7 (41.2)	0.375
Piperacillin/tazobactam, $n$ (%)	NA	NA		17 (54.8)	14 (45.2)	0.397

Abbreviations: LEP, levofloxacin extended prophylaxis; NA, not apply; Pos-LEP, post-prophylaxis period.

\* $p < 0.025$  association statistically significant (Bonferroni correction).

**TABLE 3.** Clonal diversity, genes associated with virulence, bacteriocin production and co-resistances of the faecal and bacteraemic ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates

Sequence type	PFGE pattern	BAPS <sup>a</sup>	No. patients	No. NEs	No. isolates	Virulence genes (%)			Bacteriocin production clone (patients) <sup>b</sup>	Resistance profile (%)
						esp	hyl	acm		
117	B,E,N <sup>c</sup>	2.1a	19	23	115 (4 BI)	100	14.3	100	B (2,10,12,16,20,26)	LVX, HLSR (98.3), HLGR (16.8), ERY
17	D,G,H,O,Q,T,U	3.3a	12	15	57	46.6	93.3	100	D (2), G (14), H (14), Q (26)	LVX, HLSR, HLGR (21), ERY
203	K, M	2.1a	2	2	11	100	0	100	M (17), K (41)	LVX, HLSR (80), HLGR (54.5), ERY
22	R	3.1	1	1	1	0	0	100	–	LVX, HLSR
18	A,C,J	3.3a	1	3	3	33.3	66.6	100	–	LVX (33.3), HLSR (66.6), HLGR (33.3), ERY
650	S	2.1b	1	1	3	0	0	100	–	LVX, HLSR, ERY
685	F	1.2	1	2	2	0	0	0	F	ERY
1	X	2.3b	1	1	1	0	0	100	–	LVX, HLSR, ERY
29	V	3.2	1	1	1	0	0	100	–	LVX, HLSR, ERY
264	I	2.3b	1	1	1	0	0	100	–	LVX, HLSR, ERY
272	W	7.3	1	1	1	0	0	100	–	LVX, HLSR, ERY
418	L	2.1b	1	1	1	0	100	100	–	LVX, ERY
539	P	2.3b	1	1	1	0	0	100	–	HLSR, ERY

Abbreviations: acm, adhesin of collagen of *E. faecium*; BI, bacteraemic isolates; ERY, erythromycin; esp, enterococcal surface protein; HLGR, high-level gentamicin resistance; HLSR, high-level streptomycin resistance; hyl, glycosyl hydrolase; LVX, levofloxacin; NEs, number of neutropenia episodes in which that clone was detected; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis.

<sup>a</sup>BAPS, *E. faecium* subgroup based on Bayesian analysis of population structure proposed by Willems et al. (MBio 2012;3(4):e00151–12) and Tedim et al. (Appl Environ Microbiol 2015;81:1820–31).

<sup>b</sup>Bacteriocin production refers to patients in which those clones produced bacteriocin against the reference *E. faecium* strain.

<sup>c</sup>Two colonization isolates ST117-N were resistant to linezolid.

particular clones and the replacement of others. Acquisition, persistence and clonal replacement along hospitalization for each patient are shown in Fig. S1 (see Supplementary material).

### Microbiological characteristics of AREfm clones

All clones were resistant to erythromycin and all but ST685, ST539 and ST18, were also resistant to levofloxacin. High-level streptomycin resistance was observed in the majority of AREfm clones, whereas high-level gentamicin resistance was only detected in a small proportion of ST203, ST17 and ST117 isolates (Table 3). During the follow-up period, two ST117-N colonization isolates showed resistance to linezolid after oral administration of this antibiotic [22]. No resistance to vancomycin, teicoplanin or daptomycin was detected in either colonization or bacteraemic isolates (Table 3).

The *esp* gene was present in all ST203 and ST117 (BAPS 2.1a) screened isolates and fewer than half of ST17 (BAPS 3.3a). Conversely, while the *hyl* gene was infrequent in the AREfm-ST117 clones, it was present in most of the AREfm-ST17 isolates (93.3%). The *acm* gene was homogeneously detected in the majority of isolates. Bacteriocin production was exclusively proved in a small proportion of AREfm clones corresponding with ST17, ST117, ST203 and ST685 (Table 3).

### Relative quantification of enterococcal population in faecal samples

Faecal samples of a subgroup of patients ( $n = 20$ , 11 AREfm non-colonized patients) were further studied for changes in relative amounts of the faecal microbiota by quantitative PCR. In these patients, we observed a global decrease ( $1.07 \log \text{SD} \pm 0.7$  and  $1.4 \log \text{SD} \pm 0.8$ ) of the total bacterial population in 85% of the

LEP and 80% of the Pos-LEP samples, respectively, compared with the basal ones (Fig. 2).

In AREfm-colonized patients, this general decrease in total intestinal bacteria was in contrast with the relative increase in enterococci populations observed in 77.7% of LEP (mean  $1.4 \log$ ;  $\text{SD} \pm 0.7$ ), and in 100% of Pos-LEP samples (mean  $1.75 \log$ ;  $\text{SD} \pm 0.7$ ). Intestinal enterococcal enrichment was observed concomitantly with *E. faecium* upsurge at LEP (eight of nine samples; mean  $1.7$ ,  $\text{SD} \pm 1.07$ ) and at Pos-LEP (nine of nine samples, mean  $2.1$ ,  $\text{SD} \pm 1.07$ ).

However, we detected a mean drop of  $2.3 \log$  ( $\text{SD} \pm 1.18$ ) in *E. faecium* DNA in 82% of AREfm-non-colonized patients during LEP. In 63.6% of the Pos-LEP samples, *E. faecium* remained lower than in the Basal samples. In patients p31 and p42, although not apparently colonized by AREfm by culture-dependent methods, *E. faecium* increased in Pos-LEP samples ( $1.15$  and  $3.65$ , respectively).

## Discussion

We report sequential AREfm acquisition and a high prevalence and persistence of AREfm colonization in a cohort of 52 onco-haematological neutropenic patients receiving levofloxacin prophylaxis with or without co-trimoxazole. Additionally, we show that although only a low number of patients experienced AREfm bacteraemia, 21% of ST117-colonized patients developed at least one episode with this high-risk colonizing clone during hospital admission.

In recent years a number of studies have emphasized the increasing *E. faecium* colonization rates in hospitalized patients,

Patients		Total bacteria		<i>E. faecium</i>		<i>Enterococcus</i> spp.		Dis ease
		LEP	Pos-LEP	LEP	Pos-LEP	LEP	Pos-LEP	
AREfm- non colonized	P 5	-2.01	-2.36	-0.66	-0.51	0.26	-0.59	AML
	P 7	-2.33	-1.94	-3.75	-2.88	-3.40	-1.60	AML
	P 21	-0.59	-0.71	0.26	-0.10	0.76	0.27	AML
	P 27	0.73	-0.68	0.84	0.90	0.93	1.06	AML
	P 29	-1.51	-2.10	-2.42	0.15	-3.55	-2.13	AML
	P 31	-0.22	0.38	-0.81	1.15	-0.04	-0.61	AML
	P 40	-0.93	0.14	-2.16	-0.63	0.53	-0.63	Myelof
	P 42	-0.15	-0.19	-1.37	3.65	1.05	3.01	AML
	P 44	-1.43	-1.68	-3.06	-2.18	-3.69	0.46	MCL
	P 45	-1.45	-1.33	-3.95	-2.92	-3.74	-3.14	ALL
	P 49	0.10	-1.07	-2.57	-1.26	-0.73	-3.33	ALL
	Mdn	-0.93	-1.07	-2.16	-0.51	-0.04	-0.61	
AREfm colonized	P 2	-0.39	0.51	1.84	1.89	1.20	2.34	AML
	P 3	-0.86	-1.87	2.11	2.51	1.56	1.50	AML
	P 8	-0.60	0.77	-0.29	2.43	1.83	1.65	ALL
	P 12	1.29	1.71	1.55	3.92	1.23	2.15	ALL
	P 13	-1.43	-1.24	0.51	2.23	0.37	2.08	ALL
	P 19	-1.01	-3.16	1.79	0.70	1.53	0.47	AML
	P 25	-1.44	-1.93	1.08	0.52	0.67	1.26	AML
	P 33	-0.42	-0.05	-0.23	1.69	-0.10	1.34	AML
	P 47	-1.47	-0.67	2.83	3.06	2.81	3.00	AML
	Mdn	-0.86	-0.67	1.55	2.23	1.23	1.65	

-0+

**FIG. 2.** Evolution of relative abundance of *Enterococcus faecium*, *Enterococcus* spp. and total bacteria in faecal samples of ampicillin-resistant *E. faecium* (AREfm)-colonized and non-colonized patients at Levofloxacin extended prophylaxis (LEP) and post prophylaxis (Pos-LEP) studied by quantitative PCR. Abbreviations: P, patient; Mdn, median value; AML, acute myelogenous leukaemia; ALL, acute lymphoblastic leukaemia; Myelof, myelofibrosis. Numbers reflect the log increase or decrease with respect to the basal sample. In both AREfm-colonized and non-colonized patients, total bacteria tend to diminish in LEP and Pos-LEP samples. In AREfm-colonized patients, enrichment in enterococci population, mainly due to *E. faecium* is observed whereas on the contrary decreases on enterococcal load are frequently found among non-colonized patients.

mainly in those with oncohaematological disorders, in whom notable colonization rates (34.6–40%) have been reported [11,23]. In line with these observations, we found remarkable colonization rates in up to two-thirds of the patients. During the first neutropenic episode a noteworthy number of patients were colonized at admission (Basal) which could be explained by a previous hospital admission, proved in 61.5% of them. Once patients started intensive chemotherapy and LEP, and afterwards broad-spectrum antibiotics, antibiotic selective pressure in the gut might have contributed to AREfm selection and overgrowth in the intestine leading to the observed increase in AREfm colonization rates detected at LEP and Pos-LEP. Nevertheless, the duration of LEP and the administration of a particular antibiotic regimen for febrile neutropenia could not be significantly associated with AREfm colonization in our study, even though others have reported the antibiotic selective pressure for *E. faecium* gut colonization preceding infection to be relevant. The lack of a control group, without LEP exposure, and the relatively low number of

patients, might have biased the establishment of differences in colonization and infection rates due to LEP. This is further supported by Top *et al.* in 2007, who found statistically significant association between fluoroquinolone administration and AREfm colonization [23]. In contrast, chemotherapy treatment phase (induction to remission, intensification, re-induction or haematopoietic stem cell transplantation), mucositis and duration of neutropenia were significantly associated with AREfm colonization at Pos-LEP. This suggests that differences in chemotherapy composition or clinical practice guidelines may be critical in AREfm acquisition and intestinal persistence. Nevertheless, there are two main limitations in this approach, first, the low number of patients in each category did not permit control of the possible confounding variables and second, we did not take into account the effect that differences in time-varying variables could have had on colonization rates.

To delve deeper into the colonization process, we selected a subgroup of oncohaematological patients and observed a notable

reduction in microbial abundance subsequent to chemotherapy administration. This finding contrasts with the enrichment in enterococci populations, which may be due to *E. faecium*, detected only in AREfm-colonized patients. Accordingly Vliet et al. reported bacterial counts 100-fold lower in faeces from paediatric patients with acute myeloid leukaemia than in those from healthy volunteers. This drop, explained partially by a bacteriostatic effect of chemotherapeutics, was compensated by a 100-fold increase in potentially pathogenic enterococci [24]. Enterococci intestinal overgrowth in hospitalized patients has been previously documented [25,26] and it seems to be crucial for translocation and development of bacteraemia [27]. In 2012, Taur et al. showed that enterococcal domination frequently occurred in the gut of patients receiving haematopoietic stem cell transplantation and increased nine-fold the risk of vancomycin-resistant *Enterococcus* bacteraemia [28]. Indeed, as happened with faecal colonization, an increment in *E. faecium* invasive infections associated with both vancomycin-resistant and -susceptible strains, has been detected worldwide in neutropenic patients [10,23]. In our study AREfm caused 20% of all bacteraemic episodes, being the third most common cause after coagulase-negative staphylococci (36.4%) and *Escherichia coli* (27.2%) (data not shown). Furthermore, all AREfm bacteraemia episodes were associated with the same colonizing clone, AREfm-ST117, and they occurred while the patients were neutropenic at Pos-LEP stage. Although we detected 13 different *E. faecium* STs, this clone showed the highest prevalence and persistence and it was predominant during 2009 and 2010. In a previous study of our group, this clone was frequently found colonizing and causing bacteraemia in other hospitalized patients and consequently should be considered as an epidemic high-risk clone in our institution [13]. Some traits of these high-risk clones, including high-level streptomycin resistance and levofloxacin resistance, presence of *acm* or *esp* genes or bacteriocin production might contribute to its persistence both in the intestine and in hospital environments, facilitating its adhesion to the intestine and impeding re-establishment of the normal human microbiota after chemotherapy. These characteristics may enhance the colonization ability of these clones, shifting other gut bacterial populations. This is further supported by the decrease in diversity of *E. faecium* clones that might, to some extent, reflect the decrease in all gut microbiota diversity that have been observed in other studies [28,29]. Nowadays, unlike some other European countries, vancomycin resistance in *Enterococcus* species in Spain remains low (EARS-net, [http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/database/Pages/database.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx)). However, dominance of AREfm clones might precede vancomycin resistance [30].

To date, few studies have prospectively demonstrated acquisition and persistent colonization of AREfm high-risk

clones in oncohaematological neutropenic patients and its relation with the development of bacteraemia. We provide evidence that particular multidrug-resistant high-risk clones of AREfm could emerge as an important opportunistic pathogen in the intestine of these patients, increasing the probability of translocation and the subsequent development of bacteraemia.

## Funding

This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (grant PS09/00825) and co-financed by European Regional Development Fund (ERDF) 'A Way to Achieve Europe', the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), and the European Commission (grant R-GNOSIS-FP7-HEALTH-F3-2011-282512). The European Union supported AMSD (MON4STRAT-FP7-HEALTH-2013-602906) and APT (EvoTAR-487 282004).

## Transparency declaration

The authors declare no conflict of interest.

This work was partially presented at XXIII European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin 2013.

## Acknowledgements

The authors thank Dr Javier Zamora for his valuable and wise support with statistical analysis and Mary Harper for her helpful advice with manuscript correction.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.08.008>.

## References

- [1] Viscoli C, Bruzzi P, Castagnola E, Boni L, Calandra T, Gaya H, et al. Factors associated with bacteraemia in febrile, granulocytopenic cancer patients. The International Antimicrobial Therapy Cooperative Group (IATCG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Eur J Cancer* 1994;30A:430–7.
- [2] Guthrie KA, Yong M, Frieze D, Corey L, Fredricks DN. The impact of a change in antibacterial prophylaxis from ceftazidime to levofloxacin

- in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:675–81.
- [3] Enno A, Catovsky D, Darrell J, Goldman JM, Hows J, Galton DA. Cotrimoxazole for prevention of infection in acute leukaemia. *Lancet* 1978;2:395–7.
- [4] Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis* 2011;52:e56–93.
- [5] Gafter-Gvili A, Paul M, Fraser A, Leibovici L. Effect of quinolone prophylaxis in afebrile neutropenic patients on microbial resistance: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:5–22.
- [6] Garnica M, Nouér SA, Pellegrino FLPC, Moreira BM, Maiolino A, Nucci M. Ciprofloxacin prophylaxis in high risk neutropenic patients: effects on outcomes, antimicrobial therapy and resistance. *BMC Infect Dis* 2013;13:356.
- [7] Reuter S, Kern WV, Sigge A, Döhner H, Marre R, Kern P, et al. Impact of fluoroquinolone prophylaxis on reduced infection-related mortality among patients with neutropenia and hematologic malignancies. *Clin Infect Dis* 2005;40:1087–93.
- [8] Gafter-Gvili A, Fraser A, Paul M, Vidal L, Lawrie TA, van de Wetering MD, et al. Antibiotic prophylaxis for bacterial infections in afebrile neutropenic patients following chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;1:CD004386.
- [9] Chong Y, Yakushiji H, Ito Y, Kamimura T. Clinical impact of fluoroquinolone prophylaxis in neutropenic patients with hematological malignancies. *Int J Infect Dis* 2011;15:e277–81.
- [10] Gudiol C, Ayats J, Camoez M, Domínguez MÁ, García-Vidal C, Bodro M, et al. Increase in bloodstream infection due to vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* in cancer patients: risk factors, molecular epidemiology and outcomes. *PLoS One* 2013;8:e74734.
- [11] Weisser M, Oostdijk E a, Willems RJL, Bonten MJM, Frei R, Elzi L, et al. Dynamics of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clones colonizing hospitalized patients: data from a prospective observational study. *BMC Infect Dis* 2012;12:68.
- [12] Willems RJL, Top J, van Schaik W, Leavis H, Bonten M, Sirén J, et al. Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *MBio* 2012;3. e00151–12.
- [13] Tedim AP, Ruiz-Garbajosa P, Corander J, Rodríguez CM, Cantón R, Willems R, et al. Population biology of intestinal enterococcus isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:1820–31.
- [14] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–9.
- [15] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988;26:2465–6.
- [16] Vankerckhoven V, Van Outgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004;42:4473–9.
- [17] Nallapareddy SR, Singh KV, Okhuysen PC, Murray BE. A functional collagen adhesin gene, *acm*, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect Immun* 2008;76:4110–9.
- [18] Del Campo R, Tenorio C, Jiménez-Díaz R, Rubio C, Gómez-Lus R, Baquero F, et al. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:905–12.
- [19] Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002;148:257–66.
- [20] Frahm E, Obst U. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J Microbiol Methods* 2003;52:123–31.
- [21] Maheux AF, Bissonnette L, Boissinot M, Bernier J-LT, Huppé V, Bérubé E, et al. Method for rapid and sensitive detection of *Enterococcus* sp. and *Enterococcus faecalis/faecium* cells in potable water samples. *Water Res* 2011;45:2342–54.
- [22] Sánchez-Díaz AM, Cuartero C, Lozano S, Rodríguez JD, Alonso JM, Quiles-Melero I, et al. Emergence and long-lasting persistence of linezolid-resistant *Enterococcus faecium*-ST117 in an oncohematologic patient after a nine-day course of linezolid. *Microb Drug Resist* 2014;20:17–21.
- [23] Top J, Willems R, Blok H, de Regt M, Jalink K, Troelstra A, et al. Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:316–9.
- [24] Van Vliet MJ, Tissing WJE, Dun CAJ, Meessen NEL, Kamps WA, de Bont ESJM, et al. Chemotherapy treatment in pediatric patients with acute myeloid leukemia receiving antimicrobial prophylaxis leads to a relative increase of colonization with potentially pathogenic bacteria in the gut. *Clin Infect Dis* 2009;49:262–70.
- [25] Suppola JP, Volin L, Valtanen VV. Overgrowth of *Enterococcus faecium* in the feces of patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis* 1996;23:694–7.
- [26] Ruiz-Garbajosa P, de Regt M, Bonten M, Baquero F, Coque TM, Cantón R, et al. High-density fecal *Enterococcus faecium* colonization in hospitalized patients is associated with the presence of the polyclonal subcluster CC17. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:519–22.
- [27] Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest* 2010;120:4332–41.
- [28] Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gbourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2012;55:905–14.
- [29] Woodmansey EJ, McMurdo MET, Macfarlane GT, Macfarlane S. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:6113–22.
- [30] Coque TM, Willems RJL, Fortún J, Top J, Diz S, Loza E, et al. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance? *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2693–700.



# Emergence and Long-Lasting Persistence of Linezolid-Resistant *Enterococcus faecium*-ST117 in an Oncohematologic Patient After a Nine-Day Course of Linezolid

Ana María Sánchez-Díaz,<sup>1</sup> Claudio Cuartero,<sup>1</sup> Sara Lozano,<sup>2</sup> Juan Diego Rodríguez,<sup>2</sup> Juan Manuel Alonso,<sup>2</sup>  
Inmaculada Quiles-Melero,<sup>3</sup> Javier López,<sup>2</sup> Rafael Cantón,<sup>1,4</sup> and Patricia Ruiz-Garbajosa<sup>1</sup>

We report the emergence and long-lasting persistence of linezolid resistance in an ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* strain in the intestine of a neutropenic oncohematologic patient receiving chemotherapy. The patient was first colonized by an epidemic ampicillin-resistant *E. faecium* (ARE)-ST117 clustering into lineage 78. This clone exhibited resistance to levofloxacin, erythromycin and high-level resistance to streptomycin and gentamicin. After receiving treatment with several broad spectrum antibiotics for febrile neutropenia, a 9-day course of oral linezolid was administered once the patient developed bacteraemia by the same ARE colonizing clone. Linezolid-resistant ARE was detected 17 days later in the follow-up fecal samples and persisted 41 days after suppression of linezolid therapy. Resistance to linezolid was associated with G2576T transversion in the 23S rRNA and the presence of *cfr* gene was not detected. The persistence of G2576T-ARE strains, especially in oncohematologic patients with injured intestinal membranes, could increase the risk of bacteraemia.

## Introduction

THERE HAS BEEN a marked increase in recent years of nosocomial infections due to *Enterococcus faecium*<sup>1</sup> chiefly by the success of a polyclonal subpopulation belonging to the previously designated clonal complex 17 (CC17).<sup>27</sup> A number of studies have demonstrated that these *E. faecium* hospital-associated strains (HA) differ from community commensal strains.<sup>10,30</sup> Recently, Bayesian-based population genetic modelling permitted the classification of CC17 into two different BAPS subgroups, BAPS 2-1 and BAPS 3-3, belonging to different evolutionary clusters and not sharing a recent common ancestor, as previously thought.<sup>30</sup> HA-AREfm belonging to lineages 17, 18 and 78 are mainly characterized by ampicillin, ciprofloxacin and eventually vancomycin resistance and are also enriched with putative virulence genes.<sup>27,30</sup> Enterococcal surface protein (Esp) and other genetic determinants, such as hyaluronidase (Hyl), are thought to play a role in the adaptation to the

hospital environment and seemed to enhance intestinal colonization and persistence in the gut.<sup>17,19,27</sup> It has been found that these hospital-adapted AREfm strains colonize a high proportion of oncohematologic patients receiving broad spectrum antibiotics and consequently, increasing numbers of AREfm bacteraemia have been observed in patients suffering from malignant disorders.<sup>4,29</sup>

Linezolid resistance in enterococci has been increasingly noted since the first descriptions in the year 2006.<sup>18</sup> The most widely documented mechanism conferring resistance to linezolid in *Enterococcus* spp. is transversion G2576T in the domain V of 23S rRNA gene (*Escherichia coli* numbering). However, the expression of *cfr* gene (chloramphenicol-florfenicol resistance) encoding an rRNA methyltransferase, a well established mechanism in staphylococci, may be responsible for a number of cases in enterococci.<sup>6,13,20,26</sup>

In this work we report the intestinal colonization by an AREfm-ST117 belonging to lineage 78 and the later emergence and continuing persistence of linezolid-resistant

Presented at XVI Congress of Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) - Bilbao 2012.

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Servicio de Hematología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

<sup>3</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz and Instituto de Investigación La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain.

<sup>4</sup>Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana Asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain.



RESEARCH ARTICLE

# New Insights into the *Enterococcus faecium* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Host Interaction Mechanisms

Ana María Sánchez-Díaz<sup>1,2\*</sup>, Beatriz Romero-Hernández<sup>1</sup>, Elisa Conde-Moreno<sup>3</sup>, Young-Keun Kwak<sup>4</sup>, Javier Zamora<sup>5</sup>, Patricia Colque-Navarro<sup>4</sup>, Roland Möllby<sup>4</sup>, Patricia Ruiz-Garbajosa<sup>1,2</sup>, Rafael Cantón<sup>1,2</sup>, Laura García-Bermejo<sup>3</sup>, Rosa del Campo<sup>1,2</sup>

**1** Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain, **2** Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Sevilla, Spain, **3** Grupo de Biomarcadores y Dianas Terapéuticas, Hospital Universitario Ramón y Cajal and IRYCIS, Madrid, Spain, **4** Microbiology Tumor and Cell Biology Department (MTC), Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, **5** Unidad de Bioestadística Clínica, Hospital Universitario Ramón y Cajal and IRYCIS, Madrid, Spain

\* [anit.sdg@gmail.com](mailto:anit.sdg@gmail.com)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Sánchez-Díaz AM, Romero-Hernández B, Conde-Moreno E, Kwak Y-K, Zamora J, Colque-Navarro P, et al. (2016) New Insights into the *Enterococcus faecium* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Host Interaction Mechanisms. PLoS ONE 11(7): e0159159. doi:10.1371/journal.pone.0159159

**Editor:** José A Lemos, University of Florida, UNITED STATES

**Received:** February 12, 2016

**Accepted:** June 28, 2016

**Published:** July 27, 2016

**Copyright:** © 2016 Sánchez-Díaz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information file.

**Funding:** This work was supported by The Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (PS09/00825 and PI13/205) and co-financed by The European Regional Development Fund (ERDF) 'A Way to Achieve Europe', the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), and the European Commission (grant R-GNOSIS-FP7-HEALTH-F3-2011-282512). AMSD was contracted with European Union funds

## Abstract

*Enterococcus faecium* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. gallolyticus*) were classically clustered into the Lancefield Group D streptococci and despite their taxonomic reclassification still share a similar genetic content and environment. Both species are considered as opportunistic pathogens. *E. faecium* is often associated with nosocomial bacteraemia, and *S. gallolyticus* is sporadically found in endocarditis of colorectal cancer patients. In both cases, the source of infection is commonly endogenous with a translocation process that launches through the intestinal barrier. To get new insights into the pathological processes preceding infection development of both organisms, we used an *in vitro* model with Caco-2 cells to study and compare the adhesion, invasion and translocation inherent abilities of 6 *E. faecium* and 4 *S. gallolyticus* well-characterized isolates. Additionally, biofilm formation on polystyrene, collagen I and IV was also explored. Overall results showed that *E. faecium* translocated more efficiently than *S. gallolyticus*, inducing a destabilization of the intestinal monolayer. Isolates Efm106, Efm121 and Efm113 ( $p < .001$  compared to Ef222) exhibited the higher translocation ability and were able to adhere 2–3 times higher than *S. gallolyticus* isolates. Both species preferred the collagen IV coated surfaces to form biofilm but the *S. gallolyticus* structures were more compact ( $p = .01$ ). These results may support a relationship between biofilm formation and vegetation establishment in *S. gallolyticus* endocarditis, whereas the high translocation ability of *E. faecium* high-risk clones might partially explain the increasing number of bacteraemia.



(MON4STRAT-FP7-HEALTH-2013-602906). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

*Enterococcus faecium* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. gallolyticus*) are Gram-positive inhabitants of the human and animal gastrointestinal tracts. At the beginning of the past century, they were clustered together into the Lancefield Group D streptococci based on the presence of a glycerol teichoic acid on their membranes. In 1984, DNA-DNA hybridization studies and 16S rDNA nucleotide sequencing supported the excision of these bacteria into the newly established genus *Enterococcus*, grouping the ancient *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* species, and the *Streptococcus bovis* group [1]. Over the last decade, the *S. bovis* group has been reclassified into different species and subspecies, of which the most clinically relevant species in humans is *S. gallolyticus* [2]. Despite these taxonomic changes, *E. faecium* and *S. gallolyticus* species still share metabolic routes, ecological environments and have a similar genetic content [3]. Moreover, they may act both as opportunistic pathogens, mainly in immunocompromised patients, but in different clinical contexts: *E. faecium* is often associated with nosocomial invasive infections mainly in oncohaematological, organ transplant, dialysed and intensive care-admitted patients [4,5], whereas *S. gallolyticus* bacteraemia and/or endocarditis has been strongly associated with the existence of colorectal cancer [6].

In recent years, *E. faecium* has emerged as a relevant nosocomial pathogen and is one of the most common causes of bacteraemia in European hospitals [7,8]. This increase in prevalence is related with the worldwide spread of a successful multidrug resistant hospital-adapted lineage, formerly Clonal Complex 17 (CC17) clustered by *Bayesian analysis of population structure* (BAPS) into subgroups BAPS 2.1a and BAPS 3.3a [9]. These high-risk clones are frequently enriched in putative virulence determinants such as enterococcal surface protein (*esp<sub>Efm</sub>*), hyaluronidase-like protein (*hyl<sub>Efm</sub>*) or collagen adhesin (*acm<sub>Efm</sub>*) among others [10]. On the contrary, *S. gallolyticus* is frequently associated with rural areas and livestock [11,12] and its virulence is related to its adherence ability (Pil1 pilus) and biofilm formation [13,14].

*E. faecium* and *S. gallolyticus* bacteraemia and endocarditis usually represent the final consequence of an endogenous process starting with gut translocation. This process may be favoured by some pathological conditions such as pancreatitis, trauma, surgery or cytotoxic drugs that lead to the increase of the gut barrier permeability [15]. In colorectal cancer and oncohaematological patients, the intestinal epithelium integrity is compromised and thus, permeability alterations and damage to the mucus layer are frequently observed [13,16]. In the present study, we used an *in vitro* cell culture model with Caco-2 cells to examine the differences in translocation ability through an intact epithelium of clinical and commensal strains of *S. gallolyticus* and *E. faecium* from different origins. Additionally, the adhesion and invasion properties and their ability to form biofilms on different surfaces were also determined.

## Material and Methods

### Bacterial strains

We used a collection of 6 *E. faecium* and 4 *S. gallolyticus* well-characterized strains causing bacteraemia/endocarditis and gut colonization (CEIC-106/09) (Table 1).

The *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ([www.atc.org](http://www.atc.org)) and the *Lactobacillus reuteri* (Spanish Type Culture Collection, CECT 925 T) reference strains were used as controls. All strains were grown on Columbia blood agar (Becton, Dickinson, MI, USA) for 24–48 h at 37°C except for *L. reuteri* which was cultured under anaerobic conditions on Man-Rogosa-Sharpe agar (MRS, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) supplemented with L-cysteine (0.5 g/L) for 48 h at 37°C.

## Intestinal epithelial cell line

We used the human colorectal adenocarcinoma epithelial cell line Caco-2 (European Collection of Cell Cultures) that spontaneously initiates differentiation under normal culture conditions once cells reach confluence [17]. Caco-2 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM high glucose, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) supplemented with 10% foetal Calf Serum (FCS, Thermo Fisher Scientific) and penicillin G-streptomycin-L-Glut (Gibco, Thermo Fisher Scientific) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

## Translocation assay

Caco-2 cells, seeded at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well, were cultured onto Transwell® polycarbonate membrane sterile inserts (6.5 mm diameter, 8 µm pore size, Corning, Life Science, New York, USA) until an intact confluent and differentiated monolayer was formed (10–15 days). The monolayer integrity was monitored by measuring the transepithelial electrical resistance (TER) (Millicell ERS-2 Volt ohmmeter, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) that reflected the tight junctions' strength. Assays were only performed when TER values were stable and indicative of monolayer differentiation (500–650 Ω/cm<sup>2</sup>, 12–15 days). In additional experiments immunofluorescence confocal microscopy was used as a control of Caco-2 cells confluence and differentiation degree on day 15 when TER values reached 500–650 Ω/cm<sup>2</sup> (S1 Fig).

Monolayers were then washed with PBS and pre-incubated with serum and antibiotic-free DMEM for 2 h and then bacterial inoculum was apically introduced at a MOI of 20. To determine the translocation ability, aliquots from the basolateral compartment were taken at six time points throughout 8 h and were plated onto Columbia blood agar (Difco; Becton Dickinson) or MRS for *L. reuteri* (MRS, Oxoid). Plates were incubated 48 h at 37°C and viable bacteria were counted and the number of colony forming units (CFU/ml) was determined. TER was monitored during the performance of each experiment before every sampling point and data were expressed as percentages of pre-infection TER and post-infection TER measurements. The strain translocation ability was classified as low (1–2 logs), medium (2–4 logs) or high (>4 logs) based on the final number of the translocated bacteria (CFU/ml at t = 8 h).

## Cell adherence and invasion assay

Bacterial adherence and invasion over the intestinal epithelium was assessed *in vitro* as previously described [18]. Briefly, Caco-2 cells (passages 3–15), seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well and were cultured on 24 well-plates (Corning, Life Science) for 10–14 days. After PBS (Gibco, Life Technologies) washing and serum and antibiotic-free DMEM replacement, cells were infected at a MOI of 20. After 2 h of incubation at 37°C and 5% of CO<sub>2</sub>, monolayers were washed 3 times with pre-warmed PBS to remove non-adherent bacteria and then lysed in 0.1% v/v triton-x100/PBS (Sigma-Aldrich, USA). For the epithelial cell invasion assay, after bacterial incubation and subsequent washing with PBS, extracellular adherent bacteria were killed after 1 h of incubation with 200 µg/ml streptomycin and 50 µg/ml ampicillin for *S. gallolyticus* and 10 µg/ml vancomycin and 100 µl/ml lysozyme for *E. faecium*.

Thereafter monolayers were washed thrice with PBS and lysed with 1% Triton-X-100/PBS for 15 min. Antibiotic killing efficacy in DMEM was tested previously for all strains employing  $10^7$  CFU/ml inoculum (data not shown). The adherent/invasive bacteria were determined after counting CFUs of 10-fold serial dilutions plated on Columbia blood agar. Adherence and invasion were expressed as a percentage of the inoculum.

## Biofilm formation

The ability of each isolate to form biofilm was evaluated as previously described [19] with minor modifications. Briefly, bacterial isolates were cultured overnight at 37°C in Brain Heart Infusion broth (BHI) (Becton, Dickinson) and diluted in BHI to  $10^7$  CFU/ml. Polystyrene 96-well microplates, uncoated and coated with collagen type I (rat tail, Corning BioCoat, Thermo Fisher Scientific), or type IV (mouse, Corning BioCoat, Thermo Fisher Scientific), were inoculated with 100 µl of these bacterial suspensions. After 18 h of dynamic incubation (30 r.p.m.) at 37°C, the plates were washed 3 times with PBS and dried 1 h at room temperature. Biofilms were stained with 1% crystal violet (Panreac, Barcelona, Spain) for 15 minutes then washed and air-dried. The biofilm-associated dye was solubilized in 100 µl of ethanol-acetone (75:15 v/v) and absorbance at 600 nm ( $OD_{600}$ ), representative of the amount of biofilm formed, was determined using an automatic spectrophotometer. The wells exposed only to medium without bacteria were used as negative controls. Strains were classified as follows: non-biofilm formers,  $OD_{600} < 0.120$ ; weak formers,  $OD_{600} \leq 0.240$ ; and strong formers,  $OD_{600} > 0.240$  [19]. All the above described experiments were performed in triplicate in at least three independent experiments.

## Statistical analysis

Translocation experiments were analysed using multilevel mixed linear regression models. Random effects were estimated for the variables the day of the experiment ( $n = 3$ ) and replication ( $n = 15$  for every isolate), which were considered clustering levels. Average translocation, expressed as CFU/ml, was transformed logarithmically to achieve a normal distribution. This log-transformed variable was then fitted using isolate, time and percentage of TER over basal TER as fixed effects of this model. For all analyses we considered 5% as the statistical significance level and results were referred to isolate Efm222. Biofilm formation (means  $OD_{600}$ ) and adhesion/invasion data were compared using the Mann-Whitney U-test. These statistical analyses were performed with STATA™ software version 11.0 (StataCorp LP, Texas, USA).

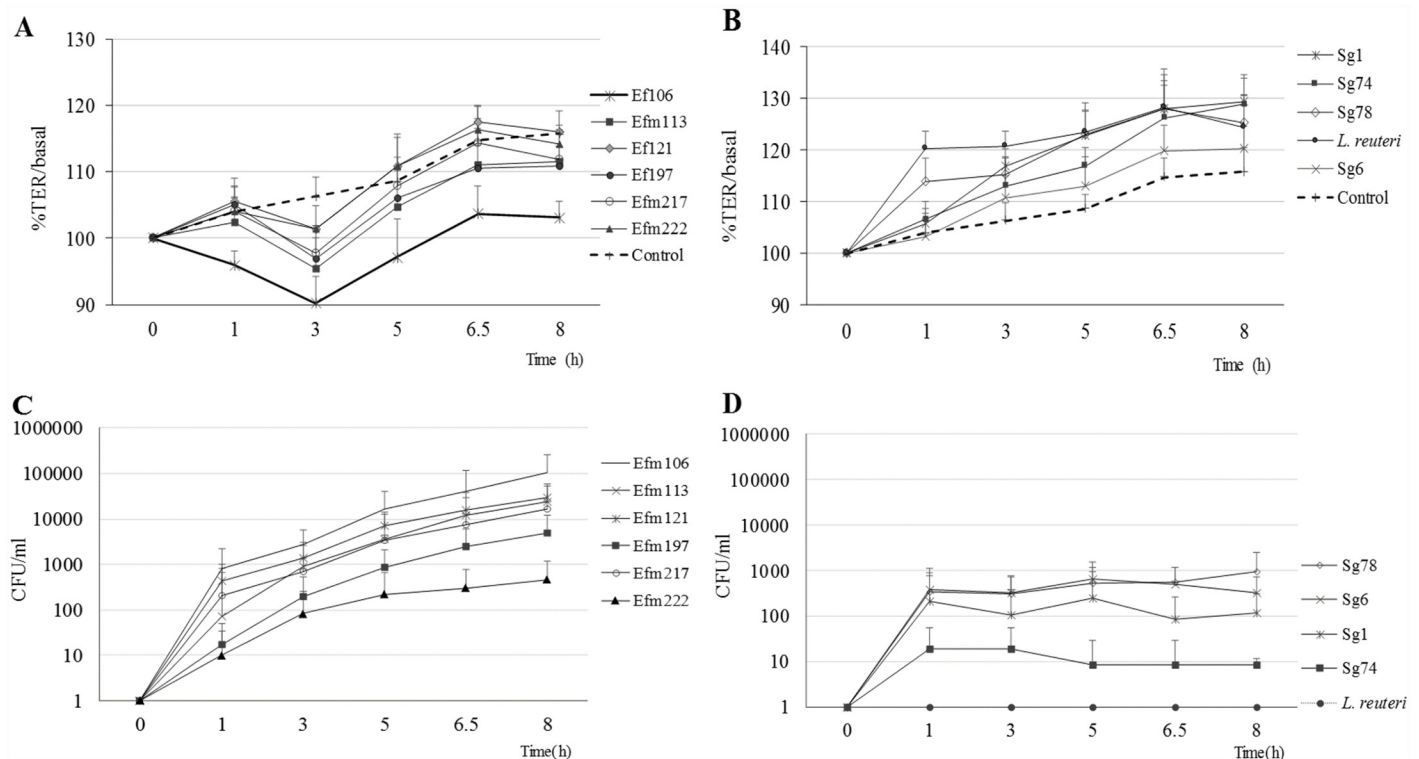
## Results

### *E. faecium* strains translocate more efficiently

All *E. faecium* strains, except the Efm222 isolate recovered from gut colonization, were able to cross through Caco-2 cells more efficiently than the *S. gallolyticus* strains (Fig 1). Indeed, the translocation ability of the four *S. gallolyticus* isolates was considered low (Sg74) or medium (Sg1, Sg6 and Sg78) whereas *E. faecium* isolates were classified as medium (Efm222) or high (Efm197, Efm217, Efm113, Efm121, Efm106). The *L. reuteri* strain was unable to translocate in any of the experiments.

The TER estimations for the Caco-2 monolayer integrity and cell differentiation were confirmed by immunofluorescence of ZO-1, E-cadherin, polymerized actin (phalloidin) and paxillin (S1 Fig). TER monitoring consistently revealed two well-differentiated behaviour patterns after the bacterial inoculum exposition: whereas *S. gallolyticus* or *L. reuteri* provoked an increase of the TER values, a clear decrease was exhibited by all *E. faecium* isolates (Fig 1).

The statistical multilevel regression model only fitted *E. faecium* strains behaviour, as several values equal to 0 obtained for *S. gallolyticus* strains deviated the model from normality. Differences in the speed of translocation (CFUs/h) of *E. faecium* isolates were not found statistically significant, and translocation increased 0.79 logs on average per hour (95% CI: 0.59–0.99) for all *E. faecium* isolates (Table 1). For all isolates and at any time, an increase of 1% in the TER value correlated with a decrease in translocation of 0.04 logarithms ( $p = .021$ ) (Table 1).



**Fig 1. *E. faecium* (A) and *S. gallolyticus* (B) TER response.** TER values were monitored before and after infection throughout an 8 h period and results were expressed as percentages of mean TER ( $\pm$ SD) at each time point in relation to basal value (before infection). ***E. faecium* (C) and *S. gallolyticus* (D) translocation across an epithelial monolayer.** Bacterial translocation was expressed as mean ( $\pm$  SD) colony forming units (CFU/ml). Translocation results for *E. faecium* strains were compared to Efm222, \* $p < .05$ . These figures summarize the results of three independent experiments comprising 3–6 replicates of each isolate.

doi:10.1371/journal.pone.0159159.g001

## *Enterococcus* is more adhesive whereas *S. gallolyticus* 78 is highly invasive

Overall, *E. faecium* strains exhibited better adhesion ability to Caco-2 (cells mean value 1.7%) than the *S. gallolyticus* ones (mean value 0.4%), although these differences were not statistically significant (Fig 2). In particular, strains Efm106, Efm113, Efm121 and Efm197, isolated from oncohaematological patients and harbouring the *esp* and *acm* genes, adhered two to six times more than *S. gallolyticus* strains. Invasion ability was not a common trait of the selected isolates. Indeed, invasion was in all cases less than 0.1% of the total inoculum, except for the Sg78 isolate. Despite its low adhesiveness, Sg78 displayed the highest invasion ability (0.28%), followed by Efm217 (0.9%) and Sg6 (0.45%). The remaining isolates showed similar invasion values (0.01% mean value, range 0.01–0.02%) (Fig 2).

## Collagen IV is an optimal surface for biofilm formation

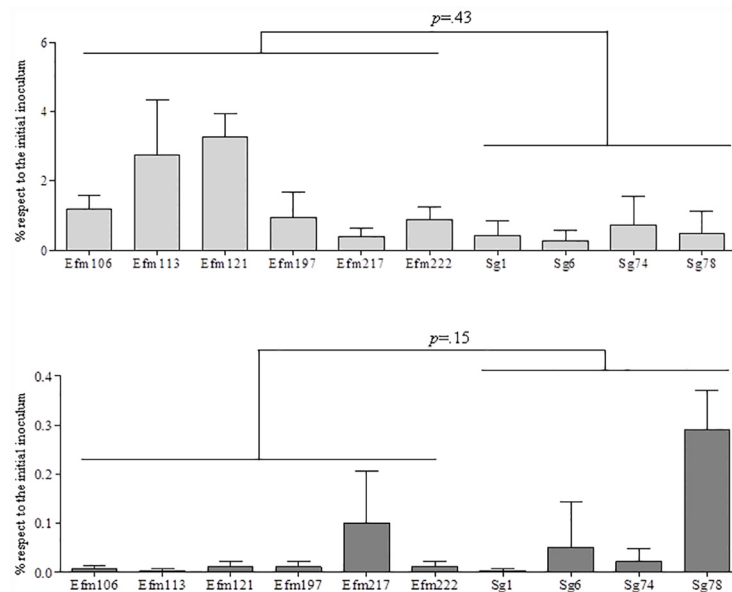
Biofilm production was heterogeneous and differed between species and surfaces (Fig 3). On the three surfaces tested, *S. gallolyticus* isolates formed biofilms more efficiently (weak or strong) than the enterococcal ones, independently of their origin. In fact, *S. gallolyticus* strains were able to strongly produce biofilm on collagen I ( $A_{600}$  0.23–1.16) and collagen IV ( $A_{600}$  0.89–2.12)-coated surfaces. Globally, the density of the biofilm produced by *S. gallolyticus* was, in all cases, significantly higher than that produced by the enterococcal species (Fig 3). On the contrary, the six *E. faecium* strains exhibited a similar pattern of biofilm production, absent on

**Table 1. Main characteristics of the strains and summary of their translocation, adhesion, invasion and biofilm formation ability.**

Strain	Source	Source	MLST (ST)	Antibiotic resistance	Other features	% TER/ basal TER (min-max)	Translocation		Adhesion	Invasion	Biofilm production			Reference
							Coefficient	Classification			Polystyrene	Collagen-I	Collagen-IV	
Efm106	OH patient	Faeces	18	Amp, HLR-S, Ery	esp, hyl, acm	90.2–103.6	3.70 (2.57–4.82)	High	High	Low	No	Strong	Weak	Sánchez-Díaz et al. 2015
Efm113	OH patient	Faeces	117	Amp, Lvx, HLR-S, HLR-G, Ery	esp, hyl, acm	95.4–112.2	3.17 (2.11–4.24)	High	High	Low	No	No	Weak	Sánchez-Díaz et al. 2015
Efm121	OH patient	Blood	117	Amp, Lvx, HLR-S, Ery	esp, acm	98–114	3.70 (2.65–4.75)	High	Medium	Low	No	No	Weak	Sánchez-Díaz et al. 2015
Efm197	OH patient	Faeces	117	Amp, Lvx, HLR-S, HLR-G, Ery, Lnz	esp, hyl, acm	96.9–110.8	0.87 (–0.19–1.93)	Medium	Medium	Low	No	Weak	Strong	Sánchez-Díaz et al. 2015
Efm217	Outpatient	Faeces	25	Amp, Lvx, HLR-S, Kan, Tet	acm	97.02–111.9	2.16 (1.10–3.21)	High	Low	Low	No	Weak	Weak	Tedim et al. 2015
Efm222	Outpatient	Faeces	699	--	--	101.3–116.3	--	Medium	Medium	Low	No	No	Weak	Tedim et al. 2015
Sg1	Patient	Blood	34	Min	pil1	105.7–128.9	NA	Medium	Low	Low	Weak	Strong	Strong	Romero et al. 2015
Sg6	Patient	Blood	35	Clin, Fos	pil1	103.1–125.2	NA	Medium	Low	Low	No	Strong	Strong	Romero et al. 2015
Sg74	Cow	Faeces	24	Hlr-S, Ery, Min, Clin, Sxt	pil1	106.4–127.2	NA	Low	Low	Low	Weak	Strong	Strong	Romero et al. 2015
Sg78	Calf	Faeces	28	Clin, Sxt, Van, Q/D	--	113.2–128.3	NA	Medium	Low	Medium	Weak	Weak	Strong	Romero et al. 2015
Efc29212	ATCC	Control	30	--	--	--	--	--	--	--	Weak	Weak	Strong	<a href="http://www.atcc.org">www.atcc.org</a>
Lr925	CECT 925T	Control	--	--	--	--	--	No	--	--	--	--	--	<a href="http://www.cect.org">www.cect.org</a>

**Abbreviations:** MLST, multilocus sequence typing; ST, sequence type; TER, transepithelial electrical resistance; OH, oncohaematological; Amp, ampicillin; HLR-S, high level resistance to streptomycin, Ery, erythromycin; Lvx, levofloxacin; HLR-G high level resistance to gentamicin; Lnz, linezolid; Min, minocycline; Clin, clindamycin; Fos, fosfomycin; Sxt, sulfamethoxazole; Van, vancomycin; Q/D, quinupristin/dalfopristin; esp, enterococcal surface protein; hyl, glycosyl hydrolase; acm, adhesin of collagen of *E. faecium*; pil1, Pil1 pilus.

doi:10.1371/journal.pone.0159159.t001



**Fig 2. Bacterial adherence and invasion of epithelial Caco-2 cells.** Adherence was analysed after 2 h of exposure while the viable internalized bacteria were counted after cell lysis. Results were presented as a percentage of the bacterial inocula and differences between the enterococcal and the streptococcal groups were compared using Mann Whitney U-test.

doi:10.1371/journal.pone.0159159.g002

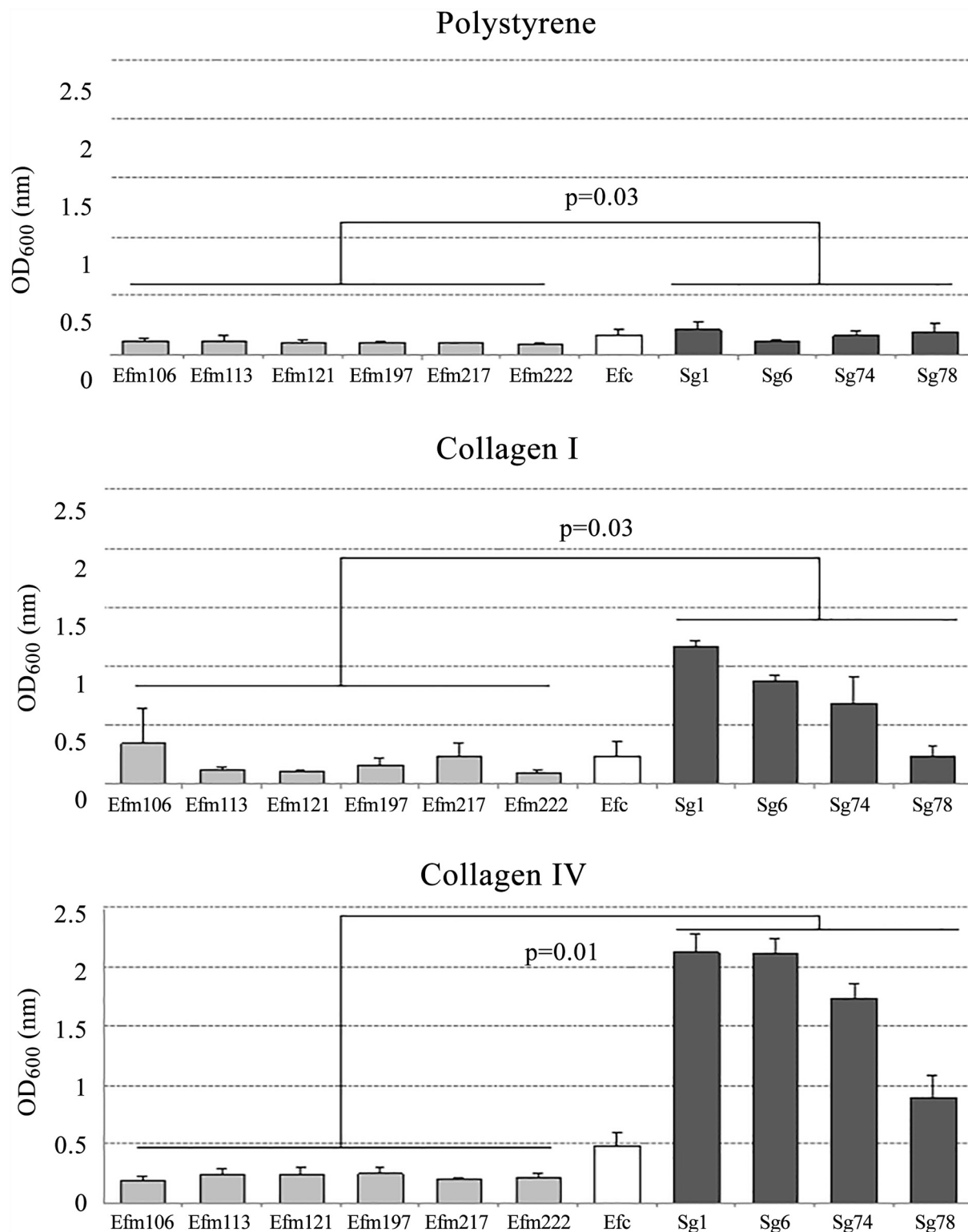
polystyrene (0/6); non-formers (3/6) or weak (2/6) on collagen I and weak (5/6) or strong formers (1/6) on collagen IV-coated surfaces, respectively. The control strain *E. faecalis* ATCC 29212 was able to form slightly more biofilm on all surfaces than *E. faecium*.

The two *S. gallolyticus* isolates from bacteraemia (Sg1 and Sg6) formed biofilm on collagen coated surfaces more efficiently than any other strain, although the low number of isolates prevented the association of the source of isolation.

## Discussion

Enterococcal and streptococcal invasive infections are complex and multifactorial processes in which both the host immune system and the bacterial virulence interplay. Most of these infections have an endogenous origin in the intestine lumen, from which bacteria cross the gut barrier by a translocation process. This phenomenon, naturally occurring in healthy individuals at a variable proportion (5–10%), may be further increased under pathological conditions such as ischemic injury, dysmotility leading to bacterial overgrowth and states of systemic immunosuppression [15]. Under normal conditions, bacteria crossing the intestinal epithelium are destroyed by phagocytes before reaching the blood circulation, thus preventing the bacteraemic process. Despite the high number of studies dedicated to characterize the gut translocation in Gram-negative bacteria, particularly in *Escherichia coli*, data about Gram-positive bacteria remains scarce. A recent study demonstrated that vancomycin-resistant enterococci are able to translocate at the same level as extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* (ESBL-*E. coli*) [20]. Both, *E. faecium* and *S. gallolyticus* represent two of the major Gram-positive species with putative gut translocation ability [15,21]; however, the clinical impact differs: *Enterococcus* causes bacteraemia more often, particularly in oncohaematological patients, whereas *Streptococcus* is more commonly involved in infectious endocarditis, almost always in association with colorectal cancer. Based on these observations, we decided to investigate the possible differences between both species concerning their innate ability to translocate since this process





**Fig 3. Production of biofilm on polystyrene, collagen I and collagen IV coated surfaces.** Isolates were classified as non-biofilm producers ( $OD_{600} < 0.120$ ), weak producers ( $0.120 < OD_{600} \leq 0.240$ ) and strong producers ( $OD_{600} > 0.240$ ). Results are expressed as mean values ( $\pm$  SD). Biofilm production among the enterococcal and the streptococcal groups was compared using Mann Whitney U-test.

doi:10.1371/journal.pone.0159159.g003

could be mainly related to the opportunity to cross a non-preserve barrier, as occurs with *S. gallolyticus* during the colorectal cancer [21].

Our results demonstrated that *E. faecium* isolates have higher inherent translocation ability than *S. gallolyticus*, independently of the origin of the isolates. We also report that the *E. faecium* high-risk clones BAPS 2.1a and BAPS 3.3a from oncohaematological patients (blood or faeces) significantly translocated more than the reference colonization Efm 222 isolate, pointing to particularities of each isolate. This high ability to translocate, along with the fact that chemotherapy deeply disrupts the mucous membranes structure [22], could partially explain why *E. faecium* bacteraemia in oncohaematological patients is exponentially increasing [7,23]. In this group of patients, the administration of antibiotics, such as quinolones or third generation cephalosporins, also leads to a reduction in gut microbiota diversity that contributes to the *E. faecium* overgrowth [24]. Several studies highlight the enterococcal dominance [25,26] and others have documented that this overgrowth precedes and may even increase up to 9-fold the risk of vancomycin-resistant *E. faecium* blood stream infection [24,27].

In our model, *E. faecium* induced a decrease in TER values below that of the control cells (not exposed to bacteria) suggesting a destabilization of the epithelium. The monitoring of the TER values has been proved to be an accurate quantitative technique to measure the integrity of tight junction dynamics in cell culture models of endothelial and epithelial monolayers. Thus, changes in the TER values have been related to the integrity/functionality of the paracellular occluding barrier [28]. Our results confirm that increases in the TER value correlated with a decrease in the *E. faecium* translocation rate, pointing to a paracellular route as the main translocation path. However, further determinations to quantify the expression and the localization of the main tight junction's components, ZO-1 and occluding, during and after bacterial exposure are required.

On the contrary, the Caco-2 monolayer cells reacted to the *Lactobacillus* and *S. gallolyticus* insults increasing the TER values. Similar findings have also been reported previously and seem to be related to a probiotic-like effect [29,30].

*S. gallolyticus* is a commensal inhabitant of the human and animal gastrointestinal tracts. However, in healthy humans the faecal carriage rate is much lower than that found in ruminants, ranging from 5–10% in adults, and is even higher in neonates [31]. Differences in gut colonization rates might be influenced by variances in adhesion abilities of the colonizing strains and by the epithelium adhesion proteins expression since the effect of bacterial inoculum on the adhesiveness/invasiveness has been ruled out by others [32].

In our work, all *S. gallolyticus* isolates, except the vancomycin-resistant Sg78 strain, exhibited low adhesiveness and had non-invasive ability. Results comparable to ours (invasion < 0.02%) were previously reported by Boleij and colleagues when human colorectal adenocarcinoma (Caco-2 and T-29) cell lines were used for the experiments [13]. However, when assays were conducted on endothelial cell lines (primary, HUVEC, or highly differentiated, EA.hy926) higher invasion rates (0.1–10% of adherent cells) were found [32]. This fact could suggest that bacterial invasiveness may also vary with cell substrates.

The *S. gallolyticus* 78, the most invasive isolate, was included due to its unusual resistance to vancomycin [11]. However, the influence of this trait could not be assessed, as we had not compared it with a vancomycin susceptible isogenic strain.

Recent studies have revealed the importance of the cellular adhesion of *E. faecium* and *S. gallolyticus* by different microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) [33,34]. These components represent a particular class of proteins expressed on the surface of these species that mediate bacterial binding to host serum and extracellular matrix proteins leading to firm attachment. Variations in the expression of these components might also modulate the translocation process and be responsible for the differences detected



in each strain. In *Enterococcus* spp., one of the best characterized is the enterococcal surface protein gene, *esp*, located on a pathogenicity island in both *E. faecalis* and *E. faecium*. In *E. faecium* the presence of *esp* has been related with initial adherence to polystyrene and biofilm formation in urinary experimental infection models [35]. Moreover, *esp* is an important marker in epidemic strains, as is the case of four of our isolates, since its presence seems to be limited to hospital-acquired *E. faecium* clones. In our experience, the *esp*<sup>+</sup> isolates were the most adhesive while displaying a very limited invasive capacity.

Aside from the recently described pathogenicity islands and *pil1* locus [36], detailed studies on the *S. gallolyticus* virulence factors remain scarce. This locus, encoding 2 LPXTG proteins (Gallo2178 and Gallo2179) and 1 sortase C (Gallo2177), was shown to be essential for adhesion to collagen I and contributed to colonization and establishment of infective endocarditis in rat models [14]. In our model, the fact that three out of four *S. gallolyticus* strains presented the *pil1* gene was not associated with an enhanced adhesiveness, and it was Sg78, the isolate lacking this operon, the most adherent and invasive isolate.

This lack of correspondence might be explained by the fact that the presence of virulent determinants is not always linked with their expression *in vivo*, and the possibility of down-regulation or merely the lack of expression should be taken into account for future studies.

The main limitation of our study is that we tested a low number of strains which impeded us to compare translocation, adhesion and invasion abilities of the strains considering the source and the intra-species particularities. However, the complex methodology of the experiments determined the number of strains, and we focused on the origin of the strains: commensal and bacteremic/endocarditis isolates.

Biofilm formation is a well-recognized virulence and antibiotic resistance factor and its expression has been related to colonization of a variety of medical devices (catheters, prosthetic heart valves or orthopaedic appliances) and is associated with several human diseases, such as native valve endocarditis or burn wound infections among others [37]. The high ability of *S. gallolyticus* to produce biofilm on collagen-rich surfaces was previously described, particularly on collagen I and IV [13]. These molecules are not usually accessible but in damaged heart valves or in polyps and early colorectal tumors they can be exposed. The high ability of *S. gallolyticus* strains to form biofilm on these surfaces may partially explain their relation with this clinical illness.

In previous studies, *E. faecium* was found to produce biofilm in a lesser extent than *E. faecalis* although its production was more frequently associated with clinical isolates carrying *esp* gene, rather than environmental or from healthy individuals [19,38]. In our work, we report similar observations but correlation with *esp* presence was not found. Differences in the biofilm production could be also related to the absence of a supplemented carbohydrate in the growing medium [19,39].

In our tertiary hospital (≈800 beds), during the period 2005–2014 we found that *E. faecium* caused two fold more cases of bacteraemia than of endocarditis (0.02 vs 0.01%), whereas the opposite situation was observed for *S. gallolyticus*, which caused eight times more endocarditis than bacteraemia (0.04 vs 0.005%) (unpublished data). The main results of our work might explain these inter-species clinical differences: *S. gallolyticus* forms more biofilm favouring the endocarditis vegetation establishment, whereas *E. faecium* is more invasive which supports the bacteraemia occurrence. In summary and despite the high genetic and biochemical similarities of both species, the results obtained in this work highlight their gut translocation abilities differences.

## Supporting Information

**S1 Fig. Assessment of Caco-2 monolayer integrity by immunofluorescence staining of ZO-1, E-cadherin, Paxillin and Phalloidin and confocal microscopy.** A) Immunofluorescence of

E-cadherin (red) and ZO-1 (green) observed by confocal microscopy. The orthogonal projection indicates that E-cadherin is uniformly distributed in the cell membrane and that ZO-1 is punctually located above the E-cadherin staining. On the right, the contrast phase image shows the monolayer confluence. B) Immunofluorescence of Paxillin (green) and polymerized actin staining (phalloidin) at cell middle (upper image) and basal level (lower image). The upper orthogonal projection image shows the actin ring and the microvilli whereas the actin stress fibres are displayed in the lower image. Paxillin staining co-localized with actin at the cell basal level, indicating the assembly of FAC (Focal Adhesion Complexes). (DOCX)

## Acknowledgments

We thank Macarena Rodríguez, Laura Martín and Edurne Ramos for their technical support with cell cultures and wise advice. We also appreciate the contributions of Dr. Elena Loza and Dr. Enrique Navas for providing clinical data of our institution.

A preliminary part of this work was presented at XXV European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)–Copenhagen 2015.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: YKK AMSD BRH ECM RM PCN. Performed the experiments: AMSD BRH ECM YKK. Analyzed the data: AMSD BRH YKK JZ RDC. Contributed reagents/materials/analysis tools: YKK RM PCN ECM LGB RDC. Wrote the paper: AMSD BRH RDC LGB RC PRG.

## References

- Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1984; 34: 31–34. doi: [10.1099/00207713-34-1-31](https://doi.org/10.1099/00207713-34-1-31)
- Romero B, Morosini M-I, Loza E, Rodríguez-Baños M, Navas E, Cantón R, et al. Reidentification of *Streptococcus bovis* isolates causing bacteremia according to the new taxonomy criteria: still an issue? J Clin Microbiol. 2011; 49: 3228–33. doi: [10.1128/JCM.00524-11](https://doi.org/10.1128/JCM.00524-11) PMID: [21752968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21752968/)
- Kreikemeyer B, Gámez G, Margarit I, Giard JC, Hammerschmidt S, Hartke A, et al. Genomic organization, structure, regulation and pathogenic role of pilus constituents in major pathogenic Streptococci and Enterococci. International Journal of Medical Microbiology. 2011. pp. 240–251. doi: [10.1016/j.ijmm.2010.09.003](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.09.003) PMID: [21112248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21112248/)
- Top J, Willems R, Blok H, de Regt M, Jalink K, Troelstra A, et al. Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. Clin Microbiol Infect. 2007; 13: 316–9. doi: [10.1111/j.1469-0691.2006.01631.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01631.x) PMID: [17391388](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17391388/)
- Weisser M, Oostdijk E a, Willems RJL, Bonten MJM, Frei R, Elzi L, et al. Dynamics of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clones colonizing hospitalized patients: data from a prospective observational study. BMC Infect Dis. BioMed Central Ltd; 2012; 12: 68. doi: [10.1186/1471-2334-12-68](https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-68)
- Boleij A, van Gelder MMHJ, Swinkels DW, Tjalsma H. Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis. 2011; 53: 870–8. doi: [10.1093/cid/cir609](https://doi.org/10.1093/cid/cir609) PMID: [21960713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21960713/)
- Gudiol C, Ayats J, Camoez M, Domínguez MÁ, García-Vidal C, Bodro M, et al. Increase in bloodstream infection due to vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* in cancer patients: risk factors, molecular epidemiology and outcomes. PLoS One. 2013; 8: e74734. doi: [10.1371/journal.pone.0074734](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074734) PMID: [24069339](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24069339/)
- Pinholt M, Østergaard C, Arpi M, Bruun NE, Schønheyder HC, Gradel KO, et al. Incidence, clinical characteristics and 30-day mortality of enterococcal bacteraemia in Denmark 2006–2009: A population-based cohort study. Clin Microbiol Infect. 2014; 20: 145–151. doi: [10.1111/1469-0691.12236](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12236) PMID: [23647880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23647880/)

9. Tedim AP, Ruiz-Garbajosa P, Corander J, Rodríguez CM, Cantón R, Willems RJ, et al. Population biology of intestinal *Enterococcus* isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81: 1820–31. doi: [10.1128/AEM.03661-14](https://doi.org/10.1128/AEM.03661-14) PMID: [25548052](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25548052/)
10. Willems RJ, van Schaik W. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol*. 2009; 4: 1125–35. doi: [10.2217/fmb.09.82](https://doi.org/10.2217/fmb.09.82) PMID: [19895216](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19895216/)
11. Romero-Hernández B, Tedim AP, Sánchez-Herrero JF, Librado P, Rozas J, Muñoz G, et al. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* from human and animal origins: genetic diversity, antimicrobial susceptibility, and characterization of a vancomycin-resistant calf isolate carrying a *vanA*-Tn1546-like element. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59: 2006–15. doi: [10.1128/AAC.04083-14](https://doi.org/10.1128/AAC.04083-14) PMID: [25605355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25605355/)
12. Dumke J, Hinse D, Vollmer T, Schulz J, Knabbe C, Dreier J. Potential transmission pathways of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. *PLoS One*. 2015; 10: e0126507. doi: [10.1371/journal.pone.0126507](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126507) PMID: [25978355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25978355/)
13. Glaser P, Hermans PWM, Boleij A, Muytjens CMJ, Bukhari SI, Swinkels DW, et al. Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp *gallolyticus* with colorectal cancer. 2011; 203: 1101–1109. doi: [10.1093/infdis/jiq169](https://doi.org/10.1093/infdis/jiq169)
14. Danne C, Entenza JM, Mallet A, Briandet R, Débarbouillé M, Nato F, et al. Molecular characterization of a *Streptococcus gallolyticus* genomic island encoding a Pilus involved in endocarditis. *J Infect Dis*. 2011; 204: 1960–1970. doi: [10.1093/infdis/jir666](https://doi.org/10.1093/infdis/jir666) PMID: [22043018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22043018/)
15. Balzan S, Quadros CDA, Cleva R De, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact. 2007; 22: 464–471. doi: [10.1111/j.1440-1746.2007.04933.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04933.x)
16. Butt J, Romero-Hernández B, Pérez-Gómez B, Willhauck-Fleckenstein M, Holzinger D, Martin V, et al. Association of *Streptococcus gallolyticus* subspecies *gallolyticus* with colorectal cancer: serological evidence. *Int J Cancer*. 2015; doi: [10.1002/ijc.29914](https://doi.org/10.1002/ijc.29914)
17. Smetanová L, SteĚtinová V, Svoboda Z, Kvetina J. Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2011; 54: 3–8.
18. Grasset E, Pinto M, Dussaulx E, Zweibaum A, Desjeux JF. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am J Physiol*. 1984; 247: C260–7. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6476109>. PMID: [6476109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6476109/)
19. Baldassarri L, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Montanaro L, Rosa D, et al. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. 2001; 113–120.
20. Van der Heijden KM, van der Heijden IM, Galvao FH, Lopes CG, Costa SF, Abdala E, et al. Intestinal translocation of clinical isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and ESBL-producing *Escherichia coli* in a rat model of bacterial colonization and liver ischemia/reperfusion injury. *PLoS One*. 2014; 9: e108453. doi: [10.1371/journal.pone.0108453](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108453) PMID: [25255079](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25255079/)
21. Boleij A, Tjalsma H. The itinerary of *Streptococcus gallolyticus* infection in patients with colonic malignant disease. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13: 719–24. doi: [10.1016/S1473-3099\(13\)70107-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70107-5) PMID: [23831427](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23831427/)
22. Van Vliet MJ, Harmsen HJM, de Bont ESJM, Tissing WJE. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathog*. 2010; 6: e1000879. doi: [10.1371/journal.ppat.1000879](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000879) PMID: [20523891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20523891/)
23. Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50: 59–69. doi: [10.1016/j.diagmicrobio.2004.05.003](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.05.003) PMID: [15380279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15380279/)
24. Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest*. 2010; 120: 4332–41. doi: [10.1172/JCI43918](https://doi.org/10.1172/JCI43918) PMID: [21099116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21099116/)
25. Ruiz-Garbajosa P, de Regt M, Bonten M, Baquero F, Coque TM, Cantón R, et al. High-density fecal *Enterococcus faecium* colonization in hospitalized patients is associated with the presence of the polyclonal subcluster CC17. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31: 519–22. doi: [10.1007/s10096-011-1342-7](https://doi.org/10.1007/s10096-011-1342-7) PMID: [21789603](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21789603/)
26. Sánchez-Díaz AM, Cuartero C, Rodríguez JD, Lozano S, Alonso JM, Rodríguez-Domínguez M, et al. The rise of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* high-risk clones as a frequent intestinal colonizer in oncohaematologic neutropenic patients on levofloxacin prophylaxis: a risk for bacteraemia? *Clin Microbiol Infect*. 2015; doi: [10.1016/j.cmi.2015.08.008](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.08.008)
27. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2012; 55: 905–14. doi: [10.1093/cid/cis580](https://doi.org/10.1093/cid/cis580) PMID: [22718773](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22718773/)

28. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems. *J Lab Autom.* 2015; 20: 107–26. doi: [10.1177/2211068214561025](https://doi.org/10.1177/2211068214561025) PMID: [25586998](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25586998/)
29. Resta-Lenert S, Barrett KE. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut.* 2003; 52: 988–97. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1773702&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. PMID: [12801956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12801956/)
30. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer RM, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* *in vivo* and protective effects on the epithelial barrier. 2010; 851–859. doi: [10.1152/ajpgi.00327.2009](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00327.2009)
31. Noble CJ. Carriage of group D streptococci in the human bowel. *J Clin Pathol.* 1978; 31: 1182–6. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1145528&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. PMID: [107199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/107199/)
32. Vollmer T, Hinse D, Kleesiek K, Dreier J. Interactions between endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates and human endothelial cells. *BMC Microbiol.* 2010; 16: 10:78. doi: [10.1186/1471-2180-10-78](https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-78) PMID: [20233397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20233397/)
33. Sillanpää J, Prakash VP, Nallapareddy SR, Murray BE. Distribution of genes encoding MSCRAMMs and Pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 896–901. doi: [10.1128/JCM.02283-08](https://doi.org/10.1128/JCM.02283-08) PMID: [19193843](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19193843/)
34. Sillanpää J, Nallapareddy SR, Qin X, Singh K V, Muzny DM, Kovar CL, et al. A collagen-binding adhesin, Acb, and ten other putative MSCRAMM and Pilus family proteins of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* Group, biotype I). *J Bacteriol.* 2009; 191: 6643–53. doi: [10.1128/JB.00909-09](https://doi.org/10.1128/JB.00909-09) PMID: [19717590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19717590/)
35. Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 52: 297–308. doi: [10.1111/j.1574-695X.2008.00383.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00383.x) PMID: [18279340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18279340/)
36. Jans C, Meile L, Lacroix C, Stevens MJ. Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). *Infect Genet Evol.* Elsevier B.V.; 2015; 33: 419–36. doi: [10.1016/j.meegid.2014.09.017](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.017)
37. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol.* 2007; 1581–1588. doi: [10.1099/jmm.0.47331-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.47331-0) PMID: [18033823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18033823/)
38. Almohamad S, Somarajan SR, Singh K V, Nallapareddy SR, Murray BE. Influence of isolate origin and presence of various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett.* 2014; 353: 151–6. doi: [10.1111/1574-6968.12418](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12418) PMID: [24606170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24606170/)
39. Heikens E, Bonten MJM, Willems RJL. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol.* 2007; 189: 8233–8240. doi: [10.1128/JB.01205-07](https://doi.org/10.1128/JB.01205-07) PMID: [17827282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17827282/)



## ORIGINAL RESEARCH

# Individual variability in finger-to-finger transmission efficiency of *Enterococcus faecium* clones

Rosa del Campo<sup>1,2</sup>, Ana María Sánchez-Díaz<sup>1</sup>, Javier Zamora<sup>3,4</sup>, Carmen Torres<sup>5</sup>, Luis María Cintas<sup>6</sup>, Elvira Franco<sup>7</sup>, Rafael Cantón<sup>1,2</sup> & Fernando Baquero<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

<sup>3</sup>Unidad de Bioestadística Clínica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>4</sup>CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

<sup>5</sup>Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain

<sup>6</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>7</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

## Keywords

Bacterial transmission, enterococcal clones, hand hygiene.

## Correspondence

Rosa del Campo, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal. Ctra. Colmenar Km 9,1. 28034-Madrid, Spain.  
Tel: +34913368330; Fax: +34913368809;  
E-mail: rosacampo@yahoo.com

## Funding Information

F. B. research was funded by the European Commission Projects PAR-241476 and EvoTAR-282004.

Received: 13 August 2013; Revised: 27 November 2013; Accepted: 2 December 2013

*MicrobiologyOpen* 2014; 3(1): 128–132

doi: 10.1002/mbo3.156

## Abstract

A fingertip-to-fingertip intraindividual transmission experiment was carried out in 30 healthy volunteers, using four MLST-typed *Enterococcus faecium* clones. Overall results showed an adequate fit goodness to a theoretical exponential model, whereas four volunteers (13%) exhibited a significantly higher finger-to-finger bacterial transmission efficiency. This observation might have deep consequences in nosocomial epidemiology.

## Introduction

Few works in Medicine have had the interventional impact of the book “Etiology, Concept and Prophylaxis of Childbed Fever” by Ignaz Philipp Semmelweis, published in 1847. More than 165 years later, hand hygiene remains a general measure that significantly contributes to the prevention and control of communicable diseases; in healthcare settings, improved hand hygiene practices reduce cross-transmission of multi-drug-resistant microorganisms, prevent healthcare-associated infections, and save costs (Stewardson et al. 2011;

Monnet and Sprenger 2012). Surprisingly, during these 165 years, very little has been done to investigate the biological basis underlying the process of bacterial transmission by hands, and particularly from the side of possible variations among individual hosts. In this study, we explored the efficiency in finger-to-finger transmission of bacteria, which may eventually be variable, in relation with different human individuals and bacterial clones. Certainly, this observation reinforces the classic historical links between microbiology, microbial ecology, and the epidemiology of infectious diseases.

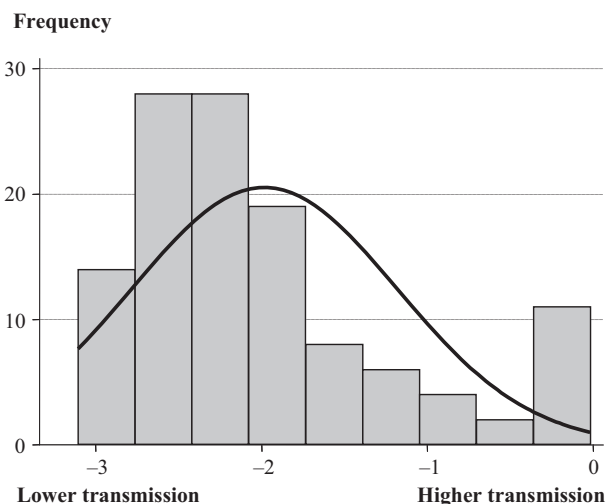
## Material and Methods

The design of the study was focused to detect possible interindividual differences by testing finger-to-finger transmission within the same individual, in comparison with other individuals. *Enterococcus faecium* was chosen as the experimental organism due to both its intestinal carriage and its capacity to produce hospital outbreaks, in which hand-to-hand transmission seems to be a critical event (Noskin et al. 1995; Duckro et al. 2005; Willems and van Schaik 2009).

We explored the possible variability in intraindividual bacterial transmission in 30 healthy young adults (20 females, 10 males, ranging 23–50 years), mostly fellows and technicians of our Department, who served as volunteers (with informed consent). Volunteers were not exposed to antimicrobial compounds (including alcohol preparations) systemically or locally (last hand wash with nonantibacterial liquid soap (Kriss 5.5; Tein S.L. Madrid, Spain), at least 90 min before sampling) or to harsh chemicals, such as acids, bases, and solvents, and were examined to ensure hands were free of clinically evident dermatoses or any other lesions. Four Multi-Locus Sequence Typing (MLST)-characterized *E. faecium* clones were included in the study: (1) ST18-CC17 *E. faecium* H182, cause of a nosocomial outbreak (Freitas et al. 2009); (2) ST203-CC17 *E. faecium* RYC49, isolated from a bacteremia in a community-patient; (3) ST315-CC17 bacteriocin-producer *vanA-E. faecium* RC714, obtained from a human intestinal colonization sample (del Campo et al. 2001); and (4) ST178-CC94 *E. faecium* L50, a multiple bacteriocin-producing strain isolated from a Spanish dry-fermented sausage (Cintas et al. 2000).

All four clones were incubated separately in 10 mL of Brain-Heart Infusion (BHI) overnight at 37°C, and then adjusted by optical density (previously tested with colony-forming units, [CFU] counts) to obtain a cell concentration of  $10^9$  CFU/mL. An aliquot of 10  $\mu$ L of each one of the clones ( $\sim 10^7$  cells) was gently deposited and spread on both thumb tip surfaces ( $\sim 130$  mm diameter, defined by four-points marks in the skin) of each volunteer. The initial bacterial load on the thumbs was assessed in the following way: after complete drying, the 100-mm-diameter

mouth of an eppendorf plastic tube containing 750  $\mu$ L of sterile saline solution at 37°C was pressed on the contaminated thumb surface (sampling surface: 0.78 cm<sup>2</sup>), and vigorously shaken five times to allow bacterial cells to be suspended into the saline. To explore finger-to-finger transmission, the second contaminated thumb was put in close static contact (assuring full surface contact, but with minimal pressure and preventing twists or wipes) for 10 sec with the index fingertip of the other hand of the same individual. Bacteria were recovered from the index fingertip by washing after application of a new eppendorf plastic tube (see above). Subsequently, the contaminated index fingertip was put in contact with the middle fingertip of the opposite hand, and the bacteria from the index finger were collected with another eppendorf tube following the previously described procedure. Finally, the middle fingertip was pressed on the ring finger of the other hand, and bacteria were again collected. All saline bacterial suspensions were immediately mixed in 1 mL of soft agar and seeded onto *M-Enterococcus* agar and incubated 24 h at 37°C for bacterial counting. After the experiment, fin-

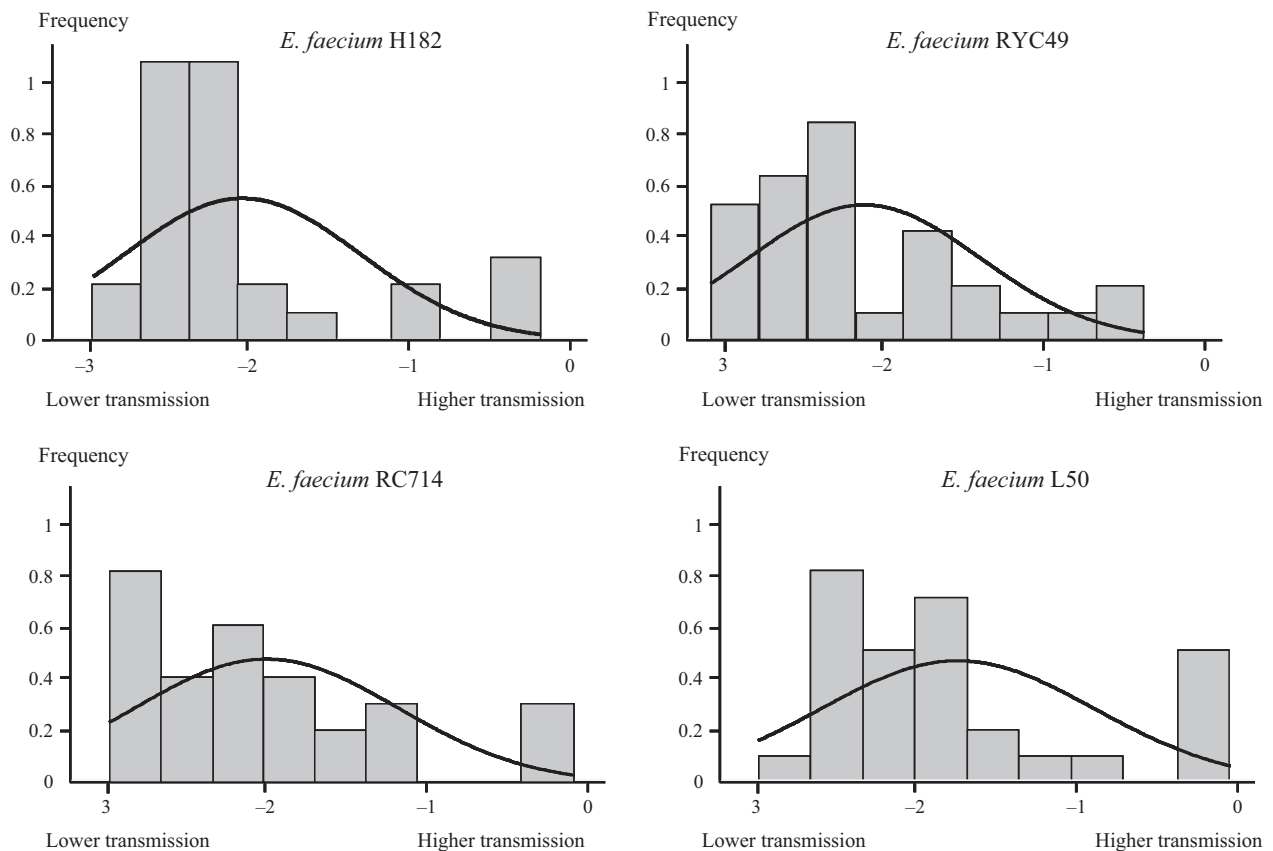


**Figure 1.** Frequency distribution of exponential decay parameter of all 30 individuals overall the four *Enterococcus faecium* clones. Note that lower decay slopes correspond to lower efficiency in the bacterial transmission.

**Table 1.** Exponential decay parameter for the *Enterococcus faecium* clones in the intraindividual transmission experiments.

Clone	Mean	SD	Shapiro-Wilks normality test	Kurtosis test	Skewness test
ST18-CC17-H182	-2.02	0.13	0.81 ( $P = 0.0001$ )	3.95 ( $P = 0.13$ )	1.39 ( $P = 0.002$ )
ST203-RYC49	-2.08	0.14	0.92 ( $P = 0.022$ )	3.00 ( $P = 0.60$ )	0.88 ( $P = 0.034$ )
ST315-RC714	-2.03	0.15	0.88 ( $P = 0.002$ )	3.42 ( $P = 0.31$ )	1.06 ( $P = 0.013$ )
ST178-CC94-L50	-1.80	0.16	0.88 ( $P = 0.002$ )	2.58 ( $P = 0.88$ )	0.86 ( $P = 0.038$ )





**Figure 2.** Frequency distribution of exponential decay parameter of all 30 individuals stratified by *Enterococcus faecium* clones.

gertips were thoroughly washed with the same liquid soap and running water and then disinfected by firmly rubbing with an alcohol preparation. The experiment was separately repeated four times per enterococcal clone and human individual along six consecutive months.

Bacterial counts into *M-Enterococcus* medium showed a consistent recovery of about ( $\sim 10^6$  cells) in the control thumb immediately (after drying time) of inoculation. An exponential decay of CFUs obtained in the sequential finger-to-finger transfers occurs in most volunteers; the transition from finger-to-finger produced typically a decay of 1.5 log in counts (decay is composed by real transmission bottleneck plus sampling-culture bacterial loss). Similar decay kinetics was found in transfer experiments from hands to surfaces in *Escherichia coli* (Lingaas and Fagernes 2009). The most frequent case in volunteers was counts of less than 10 CFUs after the third fingertip-to-fingertip transfer and no CFU recovery in the last (fourth) transfer. Unexpectedly, in a proportion of volunteers, counts of  $10^3$  and  $10^2$  CFUs were consistently obtained during the third and fourth transfers.

CFU data from the four replicates of every volunteer finger-to-finger transmission experiment were used to fit

exponential CFU count decay models, one for each of the four enterococcal clones. The exponential model assumes that the CFU count collected from every next fingertip is proportional to the previous fingertip CFU count. This assumption appears plausible. Goodness-of-fit tests were performed to assess the adequacy of the exponential models produced. The distribution of the exponential decay parameters within every clone was described and checked for normality and for the source of any departure from normal distribution (skewness and kurtosis) (D'Agostino et al. 1990). Between clones, comparison of exponential decay parameters was performed by fitting a population average panel data model by using Generalized Estimating Equations (GEE) assuming interchangeable within-individual correlation structure. Stata software v.11.0 (Stata Corp., College Station, TX) was used for the analysis.

## Results and Discussion

One-hundred twenty exponential models were fitted for the 30 individuals and the four *E. faecium* clones. The mean, standard deviation, Shapiro-Wilks normality test results, and skewness and kurtosis tests of the exponential



decay parameters are presented in Table 1. The frequency distribution of the exponential decay parameter estimated for all individuals and clones combinations clearly showed an asymmetrical right tail containing an overrepresentation of high transmitter individuals with their exponential decay parameters close to zero (Fig. 1). CFU count data from the replications of the finger-to-finger transmission experiments showed adequate goodness of fit to the proposed theoretical exponential model. In fact, only 12 out of the 120 (10%) fitted models showed some lack of fitness with goodness-of-fit test *P*-values greater than 0.05 (Figs. 1, 2). On the contrary, only four models showed lack of fit at 0.1 significance level. All four distributions showed statistical significant departures from normality caused by significant skewness. These results demonstrate that four volunteers among the 30 studied (13%) exhibited a significant higher efficiency in the intraindividual bacterial hand transmission.

Regarding the enterococcal clones, the foodborne ST178-CC94 *E. faecium* L50 clone was the most transmissible in comparison with the other grouped in the CC17, especially ST203-*E. faecium* RYC49 clone (*P* = 0.021), and also with ST-18 *E. faecium* H182 (*P* = 0.066) and ST-315 *E. faecium* RC714 (*P* = 0.057) (Fig. 2). We should be aware that the transmission of *E. faecium* CC17 clones is related with the high-density fecal colonization (Ruiz-Garbajosa et al. 2012), not necessarily depending on the parameters studied in this work.

The mechanisms involved in differences among individuals remain to be elucidated. Transepidermal water loss and fingertip temperature measurements were performed in all volunteers using the Tewameter® TM300 apparatus (Courage&Khazaka electronic GmbH, Mathias, Germany), and a digital thermometer PCE-T312. No significant association was found with any of the different transmission patterns. Other possibilities remain to be investigated, such as fatty acid composition of the skin, role of resident bacteria, corneocytes cell shedding, and anatomy of fingerprint crests. We discarded consistent differences among individuals in the finger pressure they exerted, using an ink pad and serial paper fingerprints (after contact of the volunteer's finger to a new ink pad, the finger was pressed by a single investigator on a papers' sheet; with no significant differences in the number of imprints obtained).

To our knowledge, this is the first report showing significant differences among individuals in finger-to-finger bacterial transmission. The fact that a fraction of human individuals might maintain heavy bacterial colonization in the fingers means that they will be more efficient in cross-contamination, as inoculum size influences transmission between surfaces (Montville and Schaffner 2003), and reduces efficacy of hand disinfecting procedures

(Kjoelen and Andersen 1992). We are aware of the possible consequences of our results in attributing particular risks for bacterial transmission to individual health workers or food handlers. In particular, they might have an impact on nosocomial epidemiology in the personnel involved in antinocomial infection strategies. Because of this, our results need to be reinvestigated and confirmed with more volunteers and bacterial clones from different species, and possibly in other geographical locations. We consider that this preliminary work suggests the possibility of developing an interesting model of bacterial transmission which, if adequately standardized for intrapersonal and interpersonal transmission, could be used to measure human-to-human skin transmissibility of any bacterial species, and to adapt food processing activities as well as clinical team's activities procedures.

## Acknowledgements

We thank M. I. Morosini for helpful discussions; M. García-Castillo, M. Rodríguez-Baños and A. Rodríguez for technical support. F. B. research was funded by the European Commission Projects PAR-241476 and EvoTAR-282004. We are indebted to the 30 volunteers who participated in this study.

## Conflict of Interest

None declared.

## References

- del Campo, R., C. Tenorio, R. Jiménez-Díaz, C. Rubio, R. Gómez-Lus, F. Baquero, et al. 2001. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:905–912.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández, et al. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182:6806–6814.
- D'Agostino, R. B., A. J. Belanger, and R. B. Jr D'Agostinos. 1990. A suggestion for using powerful and informative tests of normality. *Am. Stat.* 44:316–321.
- Duckro, A. N., D. W. Blom, E. A. Lyle, R. A. Weinstein, and M. K. Hayden. 2005. Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care workers. *Arch. Intern. Med.* 165:302–307.
- Freitas, A. R., C. Novais, P. Ruiz-Garbajosa, T. M. Coque, and L. Peixe. 2009. Dispersion of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to major clonal

- complexes in different portuguese settings. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4904–4908.
- Kjoelen, H., and B. M. Andersen. 1992. Handwashing and disinfection of heavily contaminated hands—effective or ineffective? *J. Hosp. Infect.* 21:61–71.
- Lingaas, E., and M. Fagernes. 2009. Development of a method to measure bacterial transfer from hands. *J. Hosp. Infect.* 72:43–49.
- Monnet, D. L., and M. Sprenger. 2012. Hand hygiene practices in healthcare: measure and improve. *Euro. Surveill.* 17: pii 20166.
- Montville, R., and D. W. Schaffner. 2003. Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7188–7193.
- Noskin, G. A., V. Stosor, and I. Cooper. 1995. Recovery of vancomycin-resistant enterococci from fingertips and environmental surfaces. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 16:577–581.
- Ruiz-Garbajosa, P., M. de Regt, M. Bonten, F. Baquero, T. M. Coque, R. Cantón, et al. 2012. High-density fecal *Enterococcus faecium* colonization in hospitalized patients is associated with the presence of the polyclonal subcluster CC17. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31:519–522.
- Stewardson, A., B. Allegranzi, H. Sax, C. Kilpatrick, and D. Pittet. 2011. Back to the future: rising to the Semmelweis challenge in hand hygiene. *Future Microbiol.* 6:855–876.
- Willems, R. J., and W. van Schaik. 2009. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol.* 4:1125–1135.



